



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA TUSCIA

FACOLTA' DI SCIENZE MATEMATICHE FISICHE E NATURALI

DEB – Dipartimento di Scienze Ecologiche e Biologiche

Dottorato in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche

XXIV Ciclo

“Caratteristiche strutturali e diversità delle comunità microbiche in sistemi acquatici ad alta variabilità ambientale: analisi dei batteri planctonici e dei biofilm”

(SSD BIO/07)

Coordinatore: Dr.ssa Roberta Cimmaruta

Tutor: Dr. Stefano Fazi

Dottorando: Dr. Giuliano Lupini

La presente tesi è stata svolta dal Dr. Giuliano Lupini nel periodo Gennaio 2009 – Febbraio 2012, presso l'Istituto Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche, nell'ambito delle attività di ricerca svolte dal gruppo di Ecologia Microbica.

Consegna della Tesi di Dottorato : 2 Marzo 2012

Discussione della Tesi di Dottorato : 20 Marzo 2012

Uno scienziato nel suo laboratorio non è soltanto un tecnico, è anche un fanciullo posto di fronte a fenomeni naturali che lo impressionano come un racconto di fate.

Marie Curie

SINTESI

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE	1
1.1 Microbial loop in ambienti costieri	1
1.2 Caratteristiche generali del biofilm	8
1.3 Aspetti generali dell'identificazione batterica	12
2. MATERIALI E METODI	17
2.1 Abbondanza batterica	17
2.2 CARD - FISH per l'analisi della comunità batterica	17
2.3 Analisi delle sequenze geniche per il 16S rDNA	21
2.4 Attività cellulare (FISH-BrdU)	22
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	25
3.1 CARATTERIZZAZIONE DELLA COMUNITA' BATTERICA IN AMBIENTE COSTIERO SOGGETTO AD UN GRADIENTE DI TROFIA	
3.1.1 Sito di studio e campionamento	25
3.1.2 Parametri chimico-fisici	27
3.1.3 Abbondanza batterica (BAB)	27
3.1.4 Abbondanza gruppi batterici	31
3.1.5 Struttura comunità batterica	36
3.1.6 Attività cellulare (FISH-BrdU)	44
3.1.7 Analisi della diversità batterica per il 16S rDNA	47
3.1.8 Conclusioni del capitolo	53
3.2 CARATTERIZZAZIONE DEL BIOFILM IN AMBIENTE FLUVIALE SOGGETTO AD UN GRADIENTE DI INQUINAMENTO ANTROPICO	55
3.2.1 Sito di studio e campionamento	55
3.2.2 Caratterizzazione chimico-fisica del fiume Llobregat	57
3.2.3 Abbondanza batterica nel fiume Llobregat	59
3.2.4 Struttura della comunità batterica	60
3.2.5 Caratterizzazione della struttura dopo la traslocazione	65
3.2.6 Conclusioni del capitolo	67
3.3 OTTIMIZZAZIONE DEL PROTOCOLLO CARD-FISH PER L'ANALISI DELLA COMUNITA' BATTERICA IN BIOFILM	69
3.3.1 CARD-FISH nei biofilm	69
3.3.2 Struttura della comunità batterica nei biofilm	73
3.3.3 Conclusioni del capitolo	78
REFERENZE	80

SINTESI

Il lavoro sperimentale condotto nell'ambito del Dottorato di Ricerca in Ecologia e Gestione delle Risorse Biologiche ha riguardato lo studio delle comunità batteriche in ambienti acquatici sottoposti ad un diverso impatto antropico. In particolare, sono state caratterizzate - le comunità batteriche planctoniche in un ambiente marino-costiero lungo un gradiente di trofia delle acque (costa-largo); - le comunità batteriche associate a biofilm in ambiente fluviale lungo un gradiente di inquinamento delle acque (monte-valle).

La prima parte dell'attività di ricerca (capitolo 3.1) era inserita in uno studio multidisciplinare del CNR dal titolo "Stima dei flussi biogenici di CO₂ in sistemi acquatici" che aveva come scopo generale quello di comprendere il ruolo dei microrganismi negli scambi di CO₂ tra i sistemi marino-costieri e l'atmosfera. In particolare l'attenzione è stata focalizzata sulle dinamiche strutturali e sull'attività delle comunità microbiche in aree a diverso stato trofico. Le indagini di campo sono state svolte sui campioni raccolti durante due campagne oceanografiche effettuate nel mese di Marzo e di Novembre 2009 nel Mare Adriatico Settentrionale lungo un transetto perpendicolare alla costa. Lo studio della struttura di comunità ha previsto l'utilizzo di tecniche biomolecolari di ibridazione *in situ* (CARD-FISH) mentre la diversità filogenetica è stata analizzata tramite il sequenziamento del 16S rDNA e la costruzione di librerie di cloni. L'attività cellulare è stata studiata per mezzo dell'incorporazione di Bromodeossiridina (BrdU-CARD). Questo studio è stato preceduto da una prima fase di ottimizzazione delle tecniche, anche attraverso la collaborazione e la permanenza per un periodo di tre mesi presso i laboratori del *Max Planck Institute for Marine Microbiology* (Brema, Germania). I risultati ottenuti mostrano come nel mese di Marzo si assista ad una completa instabilità della colonna d'acqua, caratteristica tipicamente invernale mentre nel mese di Novembre, la colonna d'acqua presenta una stratificazione termica, riconducibile ad una condizione di fine estate. Ulteriori differenze tra le due campagne sono state osservate anche per quanto riguarda le condizioni trofiche delle acque, con una situazione di oligotrofia nel mese di Marzo e di mesotrofia in Novembre, con acque più ricche in nutrienti nelle stazioni costiere e nei siti più superficiali delle stazioni intermedie. In questo contesto la comunità batterica ha mostrato delle forti relazioni con le caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua sia in termini di abbondanza che di composizione della comunità. La comunità batterica nelle stazioni costiere raggiunge densità più alte rispetto alle stazioni più al largo; al contrario, non si osservano cambiamenti significativi con il variare della profondità. Nel mese di Marzo la bassa concentrazione di fosforo e l'alto valore del rapporto N/P (156.3) sembrano limitare la crescita batterica. Nel mese di Novembre, il più elevato stato trofico delle acque si riflette in una maggiore abbondanza batterica ed i nutrienti sembrano giocare un ruolo minore nel limitare la crescita batterica, si osserva, infatti, un basso valore del rapporto N/P (7.6) più vicino al rapporto ottimale per la biomassa batterica. Anche l'attività della comunità, misurata come tasso di duplicazione cellulare tramite l'incorporazione di BrdU, mostra valori più elevati nelle stazioni costiere (in particolare nel mese di Novembre). Per quanto riguarda la dinamica dei gruppi filogenetici analizzati, seppur si osservi sempre una forte dominanza degli *Alpha-Proteobacteria* (con percentuali che raggiungono il 51% di tutte le cellule batteriche visualizzate), la composizione della comunità microbica mostra una forte stagionalità. Nel mese di Marzo si osserva una distribuzione più omogenea dei vari gruppi rispetto a Novembre in cui si evidenzia un aumento dei *Cytophaga*-

Flavobacteria contrapposto ad un netto decremento dell'abbondanza relativa del gruppo dei *Gamma-Proteobacteria*. L'abbondanza del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria*, con una forte presenza di sequenze relative al ceppo SAR11 prettamente marino (come evidenziato nelle quattro librerie di cloni per un totale di 230 sequenze) conferma l'adattabilità di questo gruppo a variazioni nelle concentrazioni dei nutrienti, soprattutto nitrati, lungo il gradiente trofico. Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* risulta essere fortemente influenzato dalla presenza di un gradiente di salinità e dall'alta concentrazione di materia organica particolata di derivazione alloctona. L'abbondanza di questo gruppo risulta maggiore sotto costa in relazione a un maggior apporto di materiale organico di derivazione fluviale. Questo dato trova conferma inoltre nella presenza di sequenze associate al genere *Fluvicola*, prettamente d'acqua dolce, a dimostrazione della forte influenza degli apporti fluviali sulla linea di costa. Anche gli *Actinobacteria*, gruppo tipico d'acqua dolce, sono stati ritrovati solo nelle stazioni più prossime alla costa. La contestuale presenza di microrganismi prettamente marini e di acqua dolce sottocosta conferma quindi il carattere ecotonale di queste zone in cui la composizione della comunità microbica risulta fortemente determinata dal rimescolamento di masse d'acqua di diversa origine. Le comunità microbiche sono quindi influenzate in termini di abbondanza, di attività e di composizione filogenetica dalle caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua, che a loro volta risentono fortemente della stagionalità.

La seconda parte del lavoro di Dottorato (capitolo 3.2) è focalizzata sulle comunità microbiche associate a biofilm in ambienti fluviali soggetti a forte impatto antropico. Le variazioni strutturali della comunità sono state studiate tramite l'applicazione della tecnica CARD-FISH. Tale studio, parte integrante di un progetto di ricerca di scambio tra IRSA e Università di Girona (Spagna), è stato effettuato lungo un gradiente di inquinamento monte-valle nel fiume Llobregat (Barcellona). Dopo i 25 giorni di accrescimento, si registra una minore abbondanza batterica nel sito con un minore impatto antropico, mentre nei siti maggiormente inquinati l'abbondanza microbica raggiunge valori significativamente più alti. Inoltre, è stato possibile osservare come nel sito a minore impatto, la comunità presenti una più omogenea distribuzione dei gruppi filogenetici analizzati, mentre nei siti a valle prevalgono i gruppi degli *Alpha-* e dei *Beta-Proteobacteria*. Per comprendere come le dinamiche della comunità batterica rispondano ad un diverso livello di impatto antropico si è proceduto alla traslocazione dei biofilm da acque provenienti da siti meno contaminati a quelle maggiormente inquinate. Interessante notare che dopo la traslocazione le comunità cresciute in zone a monte tendano ad assomigliare a quelle presenti nelle aree più impattate. Questi risultati mostrano come le caratteristiche qualitative delle acque rappresentino un fattore estremamente importante nella strutturazione delle comunità microbiche bentoniche e confermano che l'analisi delle risposte qualitative e quantitative delle comunità batteriche potrebbe diventare uno strumento essenziale sia come indice di qualità delle acque sia come *early warning system* per la contaminazione ambientale.

L'ultima parte della tesi (capitolo 3.3) è stata focalizzata sulla messa a punto della CARD-FISH in combinazione con la microscopia confocale a scansione laser (CLSM) per l'applicazione a biofilm direttamente attaccati al substrato di crescita, mantenendone inalterata la loro architettura. Fino ad ora, infatti, i microrganismi presenti nel biofilm venivano analizzati tramite tecniche che prevedevano il distacco e la disaggregazione dell'aggregato, con perdita di importanti informazioni sulla distribuzione spaziale dei ceppi batterici. La messa a punto di questo metodo offre quindi la possibilità di visualizzare i singoli ceppi batterici all'interno della struttura

tridimensionale del biofilm durante le fasi di sviluppo con importanti implicazioni nello studio delle successioni microbiche.

ABSTRACT

The studies, carried out within the Doctorate, aimed to investigate the structure and the function of the microbial community in different aquatic environments subject to anthropogenic impacts. The Thesis was focused on assessing the structure and diversity of the bacterioplankton in coastal waters with different trophic status and of the bacterial community in riverine microbial biofilms, along a gradient of increasing pollution.

The first part of the thesis (Chapter 3.1) was part of a CNR project on the role of bacteria in the carbon cycle in the Adriatic Sea. Bacterial abundance and diversity were assessed by molecular techniques (16S rDNA cloning and sequencing, CARD-FISH), while bacterial activity was estimated by immunofluorescence techniques (BrdU incorporation). All samples were collected during two oceanographic cruises (March and November 2009) along a coastal-offshore transect with increasing values of nutrients concentration. The results showed high seasonality in the water chemico-physical characteristics passing from an oligotrophic state in March to a mesotrophic state in November. In March, the low P concentration and the high values of N/P ratio (156.3) seemed to limit the bacterial growth. In November, the increasing P concentration and the N/P ratio (7.6) closed to the optimal value for bacterial growth, brought to a higher bacterial activity and abundance, with higher values in the coastal sites. Bacterial community structure was also related to the chemical-physical characteristics. The community was dominated by the *Alpha-Proteobacteria*, typical of marine environment and favoured by the low concentrations of nutrients; *Cytophaga-Flavobacteria* showed a decreasing abundance in the offshore samples directly related to particle organic matter (POC) concentration. The presence of *Actinobacteria*, typical of the freshwater environments, found in higher percentages in the coastal stations also confirmed the importance of freshwater input along the Adriatic coast. 230 sequences were analyzed for 4 clone-library from surface and deep samples. Clone library showed that the *Alpha-Proteobacteria* were mainly represented by with the genus SAR11 while *Gamma-Proteobacteria* by *Alteromonadales* and many sequences of *Cytophaga-Flavobacteria* were affiliated with *Flavobacteriales*.

The second part of the thesis (Chapter 3.2) was focused on the microbial communities associated to biofilm in riverine environments. The study, carried out in the context of an Italy-Spain exchange project, was aimed to investigate the effect of water pollution on bacterial communities in Llobregat River, Spain. Bacterial abundance was lower in the site subject to a lower anthropic impact in comparison with the downstream sites where the community showed higher abundance. In these sites a dominance of *Alpha*- and *Beta-Proteobacteria* was observed. To better understand how the bacterial communities respond to the pollutant impacts, biofilms growth in less polluted sites were exposed to water from downstream sites in a traslocation experiment. At the end of the experiment, the traslocated biofilm quickly became similar to the biofilm in the impacted sites. Our results showed that quantitative and qualitative assessment of the bacterial community composition could become an useful indicator of the water quality and an early warning system for environmental changes.

The last part of thesis (Chapter 3.3), was focused on the optimization of CARD-FISH protocol in combination with Confocal Laser Scanning Microscopy for the inspection of riverine intact biofilm attached to the original substrate for simultaneous identification and spatial localization of cells. Bacterial community composition was assessed during the biofilm development by using artificial substrates following the dynamics of specific bacterial clusters. Overall, we demonstrated that bacterial successional changes can be described by applying the CARD-FISH protocol to intact biofilms, which are ultimately from rivers, thereby avoiding biofilm detachment or manipulations. Our approach, in combination with an appropriate image analysis procedure, could contribute to elucidate how specific bacterial clusters participate to the development of the complex biofilm structures and the mechanisms that regulate community composition dynamic and cell dispersion in aquatic environments.

1. INTRODUZIONE

1.1 Microbial loop in ambiente costiero

I modelli con cui sono rappresentate le interazioni trofiche planctoniche negli ambienti acquatici hanno attribuito una forte importanza ai microorganismi con dimensioni $< 2 \mu\text{m}$, tra i quali sono compresi i batteri. Si è assunto infatti, che una frazione di carbonio fissato per via fotosintetica non venga usata dai consumatori primari in modo diretto ma vada a costituire un pool di sostanza organica non vivente, principalmente in forma disciolta. Secondo tale modello i batteri hanno assunto un ruolo centrale nel ciclo del carbonio in ambiente marino essendo gli unici organismi che riescono ad utilizzare il carbonio organico disciolto trasformandolo in biomassa e renderlo disponibile per gli organismi superiori della catena trofica (Azam, 1998). La sostanza organica presente nella colonna d'acqua subisce continui processi degradativi di natura chimico-fisica e biologica (Moran & Zepp, 1997; Keil & Kirchman, 1993) e i batteri forniscono un grande contributo alla degradazione dei più svariati composti organici (Hedges, 1992).

Nella concezione classica, le reti trofiche dei sistemi marini pelagici prendevano avvio dal fitoplancton che sintetizza sostanza organica successivamente utilizzata dai consumatori primari (zooplancton erbivoro) e da questi ultimi ai consumatori secondari. Il fitoplancton considerato era solo il cosiddetto net-fitoplancton, quello cioè catturabile con reti di maglia superiori ai $20 \mu\text{m}$, e le componenti del nano- e del pico-plancton erano assolutamente considerate trascurabili (Puddu *et al.*, 2005). Secondo tale modello il detrito organico non vivente, generato nei vari livelli trofici, veniva considerato solo nella forma particolata ed era costituito prevalentemente da organismi morti e residui metabolici (*fecal pellets*) che sedimentando sul fondo venivano così mineralizzati. Sulla base di questo modello, fino agli anni settanta, il ruolo che veniva tradizionalmente assegnato ai batteri eterotrofi marini era esclusivamente quello di mineralizzatori della sostanza organica particolata a livello bentonico.

Le biocenosi picoplanctoniche (organismi di dimensioni $< 2 \mu\text{m}$), con metabolismo sia autotrofo che eterotrofo, non venivano prese in considerazione poiché le metodologie impiegate non permettevano di valutare, né quantitativamente né qualitativamente, la biomassa e l'attività biologica di microrganismi di tali dimensioni. Questa limitazione comportava così una visione incompleta dei rapporti tra i vari livelli della catena trofica. Inoltre, poco studiata era la materia organica disciolta (DOM - *Dissolved Organic*

Matter), per ragioni di carattere metodologico. Lo sviluppo di nuove tecnologie, quali la microscopia ad epifluorescenza e l'utilizzo di coloranti fluorescenti ad alta affinità per il DNA, ha permesso di valutare la complessità e la dinamica della comunità planctonica consentendo di rivalutare profondamente la presenza e la funzione ecologica del batterioplancton. L'importanza dei batteri planctonici nel ciclo della sostanza organica dell'ecosistema marino, è stata messa in evidenza per la prima volta da Pomeroy (1974) e successivamente ripresa da Azam *et al.* (1983) con la teoria del cosiddetto "*microbial food loop*". Questa teoria parte dall'osservazione che una frazione considerevole del carbonio organico, sintetizzato dagli organismi autotrofi, rilasciato nell'ambiente in forma disciolta potrebbe sfuggire dalla catena trofica se i batteri, unici organismi in grado di utilizzare la sostanza organica disciolta non la mantenessero in circolo. La produzione fitoplanctonica, direttamente o indirettamente, fornisce DOM ai sistemi acquatici (attraverso essudati extracellulari, *sloppy feeding* e particelle in decomposizione), mentre i batteri eterotrofi, quali consumatori primari di tale substrato, ne controllano la rimineralizzazione (Azam *et al.*, 1983). Alla base della determinazione dei fattori che regolano la rimineralizzazione e l'assimilazione della sostanza organica disciolta in differenti sistemi acquatici vi è la comprensione dei processi responsabili del ciclo del carbonio in ambiente acquatico. I batteri eterotrofi, il cui metabolismo richiede l'assorbimento dei nutrienti attraverso la membrana cellulare, non possono assumere direttamente composti organici a lunga catena (polimeri) ma solo molecole a basso peso molecolare (amminoacidi, zuccheri semplici, acidi grassi). La degradazione extracellulare della sostanza organica, attraverso l'azione concatenata di numerosi enzimi idrolitici, secreti dalle cellule batteriche e specifici per i diversi legami chimici, è quindi la condizione necessaria per consentire l'ingresso all'interno della cellula della componente organica. Durante la fase attiva di crescita, il fitoplancton può produrre una quantità di prodotti di escrezione extracellulare, a basso peso molecolare e facilmente assimilabili, che supportano la crescita batterica. I diversi tipi di sostanza organica non vengono degradati tutti con la stessa velocità; alcuni, infatti, in funzione della composizione biochimica e della struttura molecolare, sono demoliti più velocemente, mentre altri richiedono tempi più lunghi. In generale le macroalghe ed il fitoplancton sono decomposti più velocemente a causa del loro alto contenuto in nutrienti e al basso contenuto in fibre e ai bassi rapporti N:C e P:C (Eyre *et al.*, 2002). I substrati con basso rapporto C:N, ricchi in azoto, sono più labili, e conseguentemente preferibilmente utilizzati e assimilati nella biomassa batterica; al contrario, substrati con alto rapporto C:N

sono meno labili, in quanto poveri di azoto, quindi difficilmente utilizzati per la sintesi cellulare batterica (Cherrier *et al.*, 1996). Successivamente alla predazione, da parte dei flagellati, dei ciliati e di altri protozoi, la biomassa è nuovamente resa disponibile per il microzooplancton, e quindi per i predatori di livelli trofici superiori. Studi di Fuhrman e Azam, (1982) hanno confermato questa teoria mostrando che, nella maggioranza degli ambienti marino-costieri, circa il 50 % della sostanza organica generata mediante fotosintesi dai produttori primari entra nel comparto della DOM ed è destinata a percorrere la catena microbica. Sulla base di queste considerazioni, valutando la diversa origine della DOM, Rassoulzadegan e colleghi (1993) hanno proposto il concetto di *microbial food web*, con il quale viene messa in rilievo la complessità dei rapporti trofici esistenti tra i vari anelli della catena alimentare marina anche a livello della componente microscopica. Lo schema "tradizionale" di catena trofica è diventato così più complesso includendo la DOM, i batteri planctonici, i virus e i batterivori. Con gli anni ulteriori informazioni importanti sui virus, rilevante causa di mortalità dei batteri e del fitoplancton con conseguente lisi cellulare e rilascio di DOM, e sui flagellati eterotrofi in grado di consumare direttamente la sostanza organica disciolta, hanno arricchito la visione del *microbial loop* di nuove interconnessioni (Sherr *et al.*, 2000) come rappresentato in Fig.1.1.1.1.

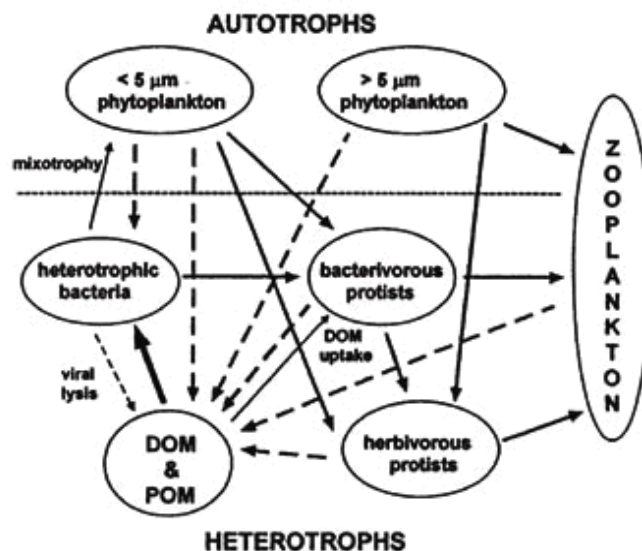


Fig.1.1.1.1 Descrizione concettuale della catena trofica microbica. Le frecce intere mostrano i percorsi attraverso cui avviene il consumo della sostanza organica mentre le frecce tratteggiate ne indicano il rilascio, sia in forma disciolta (DOM) che particolata (POM) (Sherr *et al.*, 2000).

Gli equilibri che interessano i processi microbici in ambiente acquatico coinvolgono inoltre la solubilizzazione della materia organica particolata (POM). Per effetto della decomposizione, dell'idrolisi e dell'assimilazione del substrato con produzione di biomassa, nonché, delle perdite respiratorie e del rilascio di sostanze nella massa d'acqua, il batterioplancton gioca un ruolo fondamentale nel mediare la biogeochimica di elementi fondamentali (carbonio, fosforo, azoto, ossigeno, zolfo) all'interno delle reti trofiche (Murrel, 2003). Studi recenti hanno permesso di osservare come il trasferimento di materia ed energia attraverso la catena microbica presenti un basso rendimento a causa dell'importanza dei processi catabolici (respirazione). Williams e colleghi (1998) hanno osservato una ridotta produzione ittica negli ambienti marini da loro studiati, in quanto l'85% della produzione fitoplanctonica viene utilizzata dai batteri. Da questo punto di vista il *microbial loop* rappresenta un flusso di energia scarsamente produttivo per gli organismi pelagici appartenenti ai livelli trofici più elevati, come confermato dai dati di Hagstrom *et al.* (1988) in cui il *microbial loop*, mineralizzando una significativa frazione del carbonio fotosintetico, causa una perdita di energia dalla rete trofica. Oltre al ruolo di mineralizzatori, i batteri rappresentano un'importante risorsa trofica per i loro predatori (*grazers*), soprattutto protozoi (flagellati e ciliati), ed in particolare un'abbondante risorsa di azoto e fosforo, grazie al rapporto più elevato con cui tali elementi sono contenuti nella biomassa batterica. Infatti il carbonio in essa presente è associato a quantità relativamente maggiori di azoto e fosforo (C:N:P = 45:9:1, Goldman *et al.*, 1987) rispetto a quanto si verifica nel fitoplancton (C:N:P = 106:16:1, Redfield *et al.*, 1963). Sulla base di queste osservazioni, Cho *et al.* (1990) riportano che la biomassa batterica concentra una quantità di azoto superiore rispetto alla biomassa fitoplanctonica (C/N batterico < 4; C/N fitoplanctonico = 6-7).

I diversi organismi batterici possono essere classificati come *attached* o *free-living*. Normalmente i batteri *attached* sono di maggiori dimensioni rispetto a quelli liberi, con un volume compreso tra 0.01 e 1.0 μm^3 e con un contenuto di carbonio variabile da 30 a >100 fg per cellula; pertanto, si è ipotizzato che all'interno degli aggregati, si stabiliscano condizioni nutritive particolarmente favorevoli (Simon *et al.*, 2002). Le forme macroscopiche (>500 μm) degli aggregati, detti macroaggregati, si formano in ambienti di transizione (coste, estuari), dove il carico di materia sospesa è molto più alto rispetto ai sistemi marini pelagici. Gli aggregati sembra si originino principalmente dal fitoplancton gelatinoso e dalla rottura dei biofilms bentonici risospesi dalle turbolenze della massa d'acqua. A ciò va aggiunta una larga varietà di componenti particellari tra cui

alghe bentoniche, resti di macroalghe e piante vascolari, e una grande quantità di particelle inorganiche che costituiscono la frazione maggiore degli aggregati. Tuttavia, all'aumentare della turbolenza i macroaggregati possono venire distrutti, determinando quindi una dominanza di microaggregati ($< 500 \mu\text{m}$).

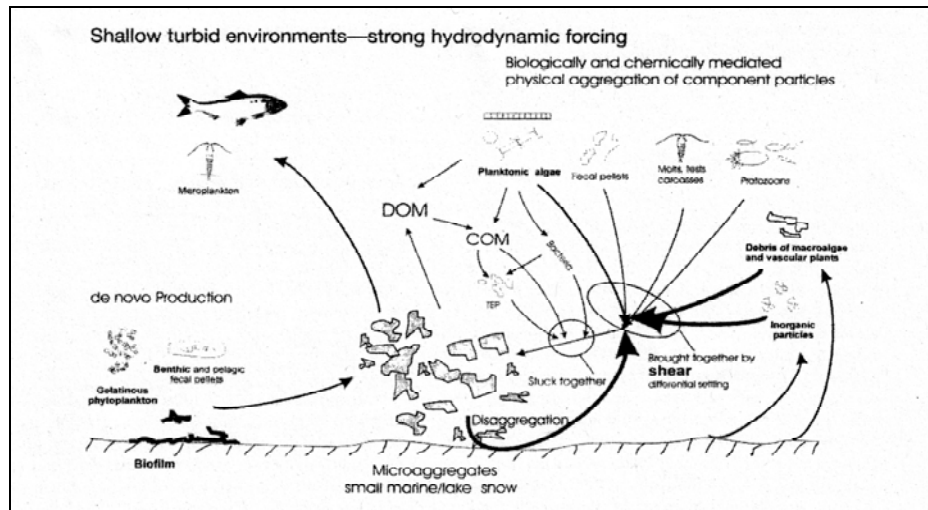


Fig. 1.1.1.2. Formazione e processi degli aggregati organici (macro- e microscopici) in ecosistemi con bassa profondità e con forte idrodinamicità. DOM: materia organica disciolta. COM: materia organica colloidale (Simon *et al.* 2002).

Un'importante caratteristica degli aggregati è quella di essere densamente colonizzati da microrganismi, con caratteristiche ambientali spesso molto specifiche (*micropatches*), fortemente diverse dall'acqua circostante. I procarioti, soprattutto batteri, sono stati trovati su tutti i tipi di aggregati (micro e macro), in ambienti marini, di fiume e di estuario e la proporzione relativa di batteri *attached* rispetto ai *free-living* varia fortemente a seconda dell'ambiente: nei sistemi pelagici è minore del 10% mentre in ambienti di estuario e di fiume è pari a circa il 90%. Le cellule batteriche di solito non sono distribuite sugli aggregati ma spesso sono ritrovate in micro-colonie. Il numero di organismi colonizzanti in genere è correlato con la grandezza dell'aggregato. I processi più importanti che avvengono negli aggregati durante la decomposizione della materia organica particolata sono: la solubilizzazione della POM, l'idrolisi e l'assimilazione del substrato con produzione di biomassa, le perdite respiratorie e il rilascio di sostanze nella massa d'acqua circostante (Simon *et al.*, 2002). Gli aggregati presentano inoltre un rapido tasso di decomposizione evidenziato dall'elevato tasso di solubilizzazione e dal

rilascio netto di substrati labili nella massa d'acqua circostante che eccede di molto la richiesta di carbonio dei microrganismi all'interno dell'aggregato.

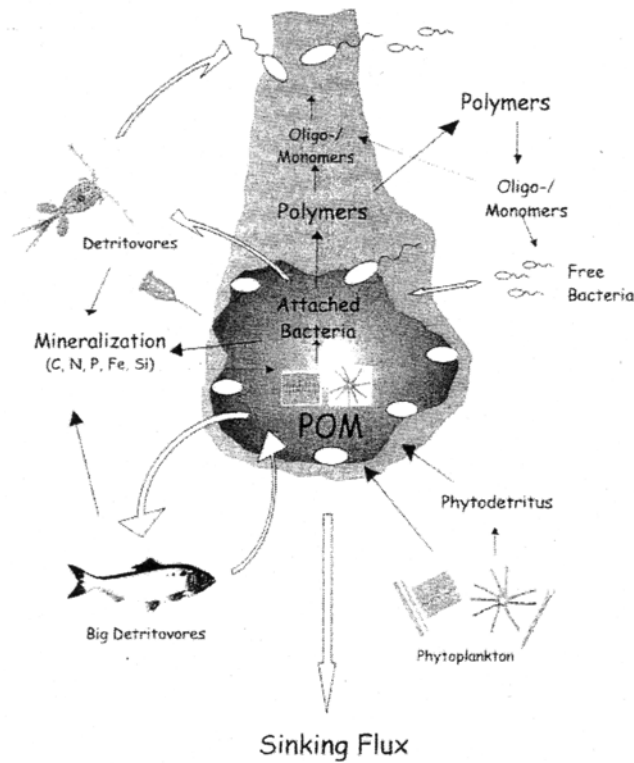


Fig. 1.1.1.3. Ciclo di decomposizione della materia organica particolata (Simon *et al.*, 2002).

Oltre al ricircolo all'interno del particolato, una grande quantità di DOM labile e di nutrienti inorganici può essere anche rilasciata nell'ambiente circostante. In alcuni casi infatti, i tassi di produzione e crescita batterica all'interno del particolato risultano più bassi rispetto a quelli presenti nella massa d'acqua circostante; in particolare i tassi di idrolisi sostanzialmente eccedono la richiesta di carbonio e di idrogeno da parte dei batteri *attached*, portando ad ipotizzare un'assimilazione da parte dei batteri associati alla POM e la sua conseguente utilizzazione da parte dei *free-living* (Azam e Smith, 1991). Gli aggregati però non sono sempre fonte di sostanze disciolte ma, possono anche fungere da *sink* per il DOM labile che viene convertito in biomassa batterica, trasportato come una frazione del POM totale verso altre aree e riconvertito in DOM sostenendo la crescita dei batteri *free living*. In sintesi, si può quindi affermare che i processi microbici

di decomposizione del DOM, unitamente a quelli del particolato, svolgono un ruolo molto importante nel ciclo del carbonio negli ambienti costieri. Il comportamento e le reazioni metaboliche dei microrganismi che utilizzano e colonizzano l'eterogenea materia organica influenzano i flussi del carbonio in tutti i suoi possibili percorsi: *microbial loop*, *sinking* (sedimentazione degli aggregati verso il fondale), catena del pascolo, accumulo di carbonio, e fissazione stessa del carbonio (Azam, 1998).

La zona costiera è il luogo dove interagiscono terra, oceano e atmosfera. L'ambiente costiero, con un'estensione di 350.000-1.000.000 km, soltanto il 7% della superficie totale degli oceani, presenta un'ampia diversità sia dal punto di vista geomorfologico che di ecosistemi (Gattuso *et al.*, 1998). Gli ambienti costieri sono caratterizzati da un'alta produttività (14 – 30% della produzione primaria), e sono responsabili dell'80% della materia organica totale e del 90% del sedimento mineralizzato (Mantoura *et al.*, 1991; Pernetta *et al.*, 1995). Le coste quindi, giocano un importante ruolo nei cicli biogeochimici, soprattutto, in relazione alla grande quantità di sostanza organica alloctona di derivazione terrestre presente. In questi ambienti, comunque, una considerevole frazione della rete trofica si basa anche sul (DOM) di origine autoctona (Hedges, 1992; Nagata, 2000). La produzione di questo DOM deriva principalmente dal fitoplancton che rilascia una gran parte della produzione fotosintetica giornaliera; altri processi che hanno un ruolo prominente nella produzione di DOM sono quelli svolti dai *grazers* e dalle lisi cellulari indotte dai virus (Nagata, 2000; Suttle, 2005). Anche le componenti strutturali delle pareti cellulari dei batteri (componenti di membrana) (Tanoue *et al.*, 1995) e dei peptoglicani (McCarthy *et al.*, 1998) possono produrre una significativa frazione del DOM (Nakata e Kirchman, 1999). Il DOM rilasciato da questi differenti processi supporta la crescita dei microorganismi eterotrofi (Pomeroy, 1974; Ducklow *et al.*, 1992; Robinson *et al.*, 2005). In questi ambienti una parte del carbonio fissato in forma di biomassa nella zona eufotica dal fitoplancton è esportato nella zona mesopelagica attraverso il mescolamento o il trasporto attivo da parte dello zooplancton. Questi processi hanno un ruolo importante nel ricircolo del carbonio e vengono comunemente definiti “pompa biologica” (Raven *et al.*, 1999).

I sistemi costieri, tra cui le lagune e gli estuari, risultano essere gli ecosistemi naturali più produttivi. (Abreu *et al.*, 1994; Cassel *et al.*, 1996). All'interno dei sistemi costieri sono inoltre inseriti gli ambienti di estuario, che sono aree di transizione tra il mare e i fiumi. La caratteristica principale degli estuari è la formazione di un gradiente di densità tra l'acqua dolce e quella di mare. Queste acque quindi risultano essere caratterizzate da

un'alta concentrazione di nutrienti e di detrito sospeso che le contraddistinguono per una più alta produttività rispetto a quelle di mare aperto. La produzione non è uniformemente distribuita, ma è concentrata in due aree principali: la zona cosiddetta di *up welling* e quella della striscia più prossima alla costa. La produzione primaria è confinata nello strato più alto eufotico, ma, quando il fitoplancton muore o è predato e incorporato dallo zooplancton si accumula sul fondo dove viene processato attraverso la catena trofica con successivo rilascio di minerali, generando così una separazione spaziale tra le acque profonde ricche di nutrienti e la zona eufotica di superficie. Successivamente un qualsiasi processo di *up welling* delle acque ricche di nutrimento favorirà la rimessa in circolo di nuovi nutrienti che daranno vita ad un altro processo produttivo. Un'altra maggiore stimolazione della produttività in questi ambienti arriva dall'incontro tra acque dolci e acque salate. Le acque dolci, provenienti dai fiumi, scorrendo verso il mare danno vita ad una stratificazione delle acque. Correnti turbolente forzeranno l'incontro delle due masse di acque così da favorire il mescolamento dell'acqua salata con quella dolce generando una risalita di nutrienti dal fondo. Tali rimescolamenti fanno sì che i parametri chimico-fisici in tali ambienti possano variare fortemente rendendo questi ambienti altamente dinamici e produttivi. A causa dell'ampia variazione dei parametri chimico-fisici, inclusi salinità, sostanza organica e concentrazione dei nutrienti, gli ambienti di estuario creano un habitat di transizione molto selettivo che influenza fortemente la dinamica e la diversità delle comunità microbiche (Barcina *et al.*, 1997; Giovannoni *et al.*, 2000; Little, 2000).

1.2 Caratteristiche generali del biofilm in ambienti fluviali

I corsi d'acqua sono complessi sistemi idrodinamicamente aperti caratterizzati da una corrente unidirezionale e possono essere considerati come una successione di ecosistemi connessi l'uno con l'altro. Vannote nel 1980 ha proposto il *River continuum concept* focalizzando l'attenzione sulla stretta dipendenza che esiste tra la struttura e la funzione delle comunità biologiche in relazione alle condizioni geomorfologiche e idrauliche del sistema fisico. Secondo tale modello le comunità di produttori e consumatori sono distribuite secondo un gradiente di variabili morfologiche e fisiche, quali la larghezza, la profondità, la velocità, la portata, la temperatura ed il carico di sedimenti di un fiume (Vannote *et al.*, 1980). Nei corsi d'acqua i tratti a valle sono costantemente influenzati dalle condizioni del tratto a monte, e per questo costituiscono un *continuum*. Lungo

questo *continuum* del fiume è possibile riconoscere una successione di cambiamenti riguardanti il metabolismo delle comunità lotiche, la diversità biotica e le caratteristiche del materiale particolato. Nei tratti iniziali le comunità biologiche acquatiche sono sostenute da una grande quantità di detrito organico alloctono (*input*), che deriva dalla vegetazione ripariale (foglie e rami), e da un ridotto sviluppo dei produttori fotosintetici (es. alghe) causato dall'ombreggiamento di quest'ultima. Il metabolismo fluviale è quindi prevalentemente eterotrofo, sostenuto dagli apporti organici terrestri, e la struttura della comunità è dominata dai detritivori macroinvertebrati. Procedendo verso valle, nei fiumi di media grandezza, la riduzione della superficie ombreggiata e il conseguente aumento della fotosintesi inducono il passaggio ad una comunità acquatica energeticamente meno dipendente agli apporti di detrito che, tuttavia, continuano ad essere un importante risorsa; aumentano gli erbivori a scapito dei detritivori, mentre gli organismi raccoglitori continuano ad abbondare, sfruttando il particolato fine prodotto nei tratti a monte. Nei tratti ancora più a valle dei grandi fiumi, in relazione ad una diminuzione dell'attività fotosintetica a causa della torbidità delle acque, il metabolismo fluviale torna ad essere eterotrofo e le comunità acquatiche presentano una ridotta varietà di specie. Nelle acque correnti, l'energia deriva principalmente dalla materia organica morta, che passa dalla catena di pascolo alla catena del detrito e che può essere distinta in alloctona ed autoctona a seconda della sua origine; il materiale autoctono è rappresentato dal carbonio precedentemente fissato all'interno del sistema; l'alloctono proviene invece dall'esterno dell'ecosistema ed è costituito principalmente da foglie e detrito vegetale. L'apporto di materiale alloctono è generalmente continuo, anche se nelle zone temperate gli *input* più consistenti si registrano in autunno, per la caduta delle foglie, ed in primavera per la massima portata dei corsi d'acqua. Il materiale organico particolato (POM) generalmente viene definito come "detrito", può essere ulteriormente suddiviso in ultrafine (0.5 μm -50 μm), fine (50 μm -1000 μm) e grossolano (*Coarse* - CPOM, >1000 μm). Il CPOM è costituito principalmente da materiale di origine terrestre che deriva dalla vegetazione ripariale (Cummins e Klug, 1979) e che costituisce il 90% dell'*input* organico nei sistemi fluviali (Scorgie, 1974). Nel materiale di origine vegetale la maggior parte dell'energia è intrappolata nella cellulosa e nella lignina, che insieme costituiscono più del 50% delle foglie e del legno (Kaarik, 1974). Pochissime specie animali sono in grado di utilizzare direttamente la cellulosa e la lignina (Monk, 1976). Al contrario molte specie di funghi (in particolare gli *Hyphomycetes* nei sistemi acquatici) e batteri sono coinvolti nella degradazione di tali molecole grazie anche alla produzione di enzimi extracellulari.

Un'efficiente utilizzazione del detrito vegetale implica, quindi, una complessa serie di interazioni tra il detrito e i microrganismi e solo successivamente tra questi e specie animali quali i detritivori invertebrati. L'importanza del CPOM nei sistemi fluviali è anche legata ai tempi di permanenza delle particelle grossolane all'interno del sistema affinché queste possano essere colonizzate dai microrganismi ed entrare nella catena del detrito. Young *et al.* (1978) riportano che la probabilità che una particella trasportata all'interno di un corso d'acqua sia trattenuta è funzione della "efficienza di trattenimento" determinata dalle caratteristiche del fondo e delle zone ripariali. Le particelle possono essere trattenute anche quando la velocità di corrente è minore di quella richiesta a mantenere le particelle in movimento nella colonna d'acqua (Jones e Smock, 1991). Il FPOM deriva direttamente da *input* di origine terrestre o indirettamente dal frazionamento del CPOM per azione di organismi detritivori (Wotton, 1990). Il FPOM è una risorsa importante per molti invertebrati ed alcuni vertebrati filtratori (Benke *et al.*, 1984) e spesso si deposita principalmente in zone di ristagno e nelle piane di esondazione (aree *sink*) (Grubaugh e Anderson, 1989). Il DOM, infine, rappresenta un'importante frazione del carbonio organico presente nei fiumi, ed è composto sia da sostanze umiche, la maggior parte delle quali non è utilizzata nella catena trofica ma trasportata direttamente a valle, sia da composti più instabili e di minori dimensioni utilizzati rapidamente dai microrganismi planctonici. Il DOM di derivazione planctonica è ricco di proteine e polisaccaridi labili, mentre quello di derivazione terrestre e derivato dalla degradazione del POM e del FPOM, è più ricco di sostanze umiche e polisaccaridi, come la lignina e la cellulosa, relativamente resistenti alla mineralizzazione da parte dei batteri (Benner, 2002). Il DOM, nei fiumi, sembra essere meno labile rispetto a quello dei sistemi marini dove ha origine principalmente planctonica. Come si vedrà di seguito, il *biofilm*, ossia la pellicola biologica risultante dall'adesione di microrganismi, autotrofi ed eterotrofi, su una superficie sommersa (ad esempio rocce), è un importante sito di assorbimento del DOM. Negli ecosistemi fluviali, la comunità microbica bentonica, definita "*attached*", gioca un ruolo molto più importante nella mineralizzazione della sostanza organica e dei nutrienti rispetto alla comunità planctonica. La crescita della comunità batterica sul substrato è accompagnata da quella di organismi autotrofi, quali diatomee, cianobatteri, e da organismi eterotrofi (funghi e protozoi). Tutti questi organismi sono inseriti in una matrice polimerica extracellulare esopolisaccaridica (EPS) aderente al substrato che prende il nome di biofilm (Lock, 1993). L'EPS è costituita da un insieme di differenti classi di macromolecole quali polisaccaridi, proteine, acidi nucleici e

fosfolipidi. Tali molecole, responsabili di forze coesive, determinano la conformazione architettonica tridimensionale del biofilm. Altra caratteristica dell'EPS è quella di rispondere alle variazioni delle concentrazioni di sostanze organiche, offrendo in questo modo una protezione alla comunità dagli stress ambientali (Wingender *et al.*, 1999). In generale, gli aggregati microbici sono costituiti per circa il 60-90% da sostanze polimeriche extracellulari (Nielsen *et al.*, 1997); tali strutture conferiscono una maggiore resistenza alle cellule del biofilm all'essiccamento ed alla predazione rispetto al loro omologhi planctonici. Le strette relazioni tra differenti organismi fanno sì che nei biofilm avvengano importanti interazioni (come per esempio l'utilizzo di essudati algali) che permettono di considerare queste comunità "*attached*" come un micro-ecosistema caratterizzato da una complessa struttura dove hanno luogo tutti i processi di mineralizzazione.

Le fasi principali dello sviluppo del biofilm come descritte da Hamilton e colleghi (1989) sono: adesione, crescita e dispersione. I fattori che permettono l'adesione al substrato sono molte, tra i quali, in particolare, le proprietà della superficie, lo stato fisiologico dei microrganismi e le condizioni idrodinamiche dell'ambiente in corrispondenza alla superficie. La successiva duplicazione cellulare e la produzione di sostanze polimeriche, permettono una colonizzazione del substrato e aumentano maggiormente l'adesione cellulare fino alla formazione di una struttura stabile. Negli anni passati diversi studi hanno cercato di analizzare la formazione del biofilm in ambiente acquatico, concentrando però l'attenzione sulla successione delle comunità algali. Studi condotti da Battin *et al.* (2007) hanno invece focalizzato l'attenzione sulla formazione di biofilm microbici evidenziando tre principali fasi nella crescita del biofilm: 1) fase iniziale di formazione (< 10 giorni), 2) fase di crescita precoce (tra 11 e 50 giorni), 3) fase di biofilm maturo (tra 51 e 90 giorni). La formazione di biofilm batterici viene considerata come una successione nella struttura e nella composizione delle comunità. Il processo di successione inizia con un attacco stocastico di specie che sono reclutate tra le diverse popolazioni microbiche presenti nel flusso d'acqua, dando vita così ad un monostrato di cellule sulla superficie. Nella prima fase di formazione si verifica una pressione di selezione basata sulla capacità di adesione al substrato. Successivamente alla colonizzazione batterica primaria si ha una colonizzazione secondaria, nella quale i batteri sono molto più competitivi rispetto allo spazio ed alle risorse.

1.3 Aspetti generali dell'identificazione batterica

Negli ultimi decenni la maggiore sfida dell'Ecologia Microbica è stata quella di sviluppare metodi molecolari per meglio caratterizzare le comunità microbiche nel loro ambiente naturale (Wagner, 2004). Le nuove metodologie molecolari, basate sull'analisi delle sequenze 16S rDNA, hanno permesso di approfondire le conoscenze sulla diversità delle comunità batteriche e di comprendere i meccanismi che ne regolano la dinamica (Urakawa *et al.*, 1999; Riemann *et al.*, 2000; Ravenschlag *et al.*, 2001). In particolare attraverso l'impiego di queste tecniche si sono potuti studiare nuovi consorzi microbici coinvolti nei cicli biogeochimici e le loro risposte ai vari stress ambientali. I batteri non presentano dettagli morfologici per una facile identificazione ed in passato soltanto per i batteri coltivabili era possibile un'identificazione (Relman, 1993; Amann, 1995; Amann & Kuhl, 1998). Poiché solo una porzione dei microorganismi, circa il 10%, è coltivabile solo con l'applicazione dei metodi molecolari, per lo più derivati dalle scienze mediche e basati sull'analisi del 16S rDNA (Fig. 1.3.1.1), si è potuta studiare la diversità batterica direttamente *in situ* negli ecosistemi (Head *et al.*, 1998; Connon & Giovannoni, 2002; Kaeberlein *et al.*, 2002; Torvisk and Øvreas, 2002).

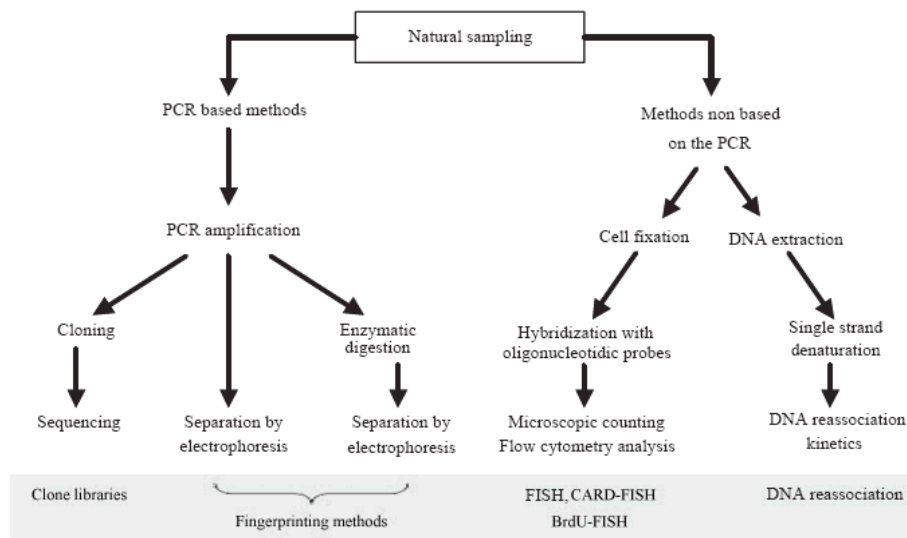


Fig. 1.3.1.1. Diagramma dei differenti approcci molecolari per caratterizzare la diversità delle comunità microbiche. FISH = Fluorescence *In Situ* Hybridization; CARD-FISH = FISH in combinazione con l'amplificazione del segnale; BrdU-FISH = FISH in combinazione con l'incorporazione della bromodeossiuridina per caratterizzare l'attività cellulare specifica (modificata da Dorigo *et al.*, 2005).

La ricerca di marcatori genetici che possano essere utilizzati per una dettagliata analisi filogenetica ha portato a concentrarsi sui geni codificanti l'rRNA ribosomiale. Questi geni possono essere considerati degli eccellenti marcatori sia per la presenza al loro interno di sequenze altamente conservative, fondamentali per delineare le attuali relazioni evolutive, sia per la presenza di regioni con una certa variabilità per una più specifica identificazione. I ribosomi sono costituiti da più di 50 proteine differenti in combinazione con una miscela di RNA di diverse dimensioni, misurate in funzione della velocità di sedimentazione ($1S = 1 \times 10^{-3}$ sec). In questo modo è possibile distinguere le diverse molecole di 5S rRNA, 16S rRNA, 23S rRNA (Olsen *et al.*, 1986). Le applicazioni in Ecologia Microbica, hanno focalizzato l'attenzione su molecole di RNA più lunghe quali l'rRNA 16S, costituito mediamente da circa 1500 basi, e sull'rRNA 23S con i suoi 3000 nucleotidi. Queste due molecole racchiudono tutte le informazioni necessarie per accurate analisi filogenetiche. Successivamente alle prime applicazioni il gene per l'rRNA 16S è stato sequenziato in una grande varietà di organismi viventi. Tali informazioni sono state utilizzate da Woese (1987) per determinare la distanza evolutiva in base alle differenze nella sequenza nucleotidica. L'analisi comparative delle sequenze 16S rDNA è al momento il metodo più comune utilizzato per lo studio della filogenesi dei microorganismi, in quanto le sequenze dell'rDNA possono essere ottenute

direttamente dai campioni ambientali senza passare per la coltivazione in piastra. La tecnica del sequenziamento, è molto complessa e richiede l'estrazione degli acidi nucleici da campioni ambientali, la formazione di cloni contenenti la sequenza d'interesse ed infine la costruzione di una libreria genica per la caratterizzazione dei campioni ambientali (Brock *et al.*, 2003). Negli ultimi anni il numero delle sequenze accessibili è rapidamente aumentato. Ad oggi, più di 30.000 sequenze geniche batteriche di campioni ambientali sono disponibili (Ribosomal Database Project – RDP, *Real Environmental Genomics Project* - REGX) molte delle quali rappresentano specie relazionate a batteri coltivabili.

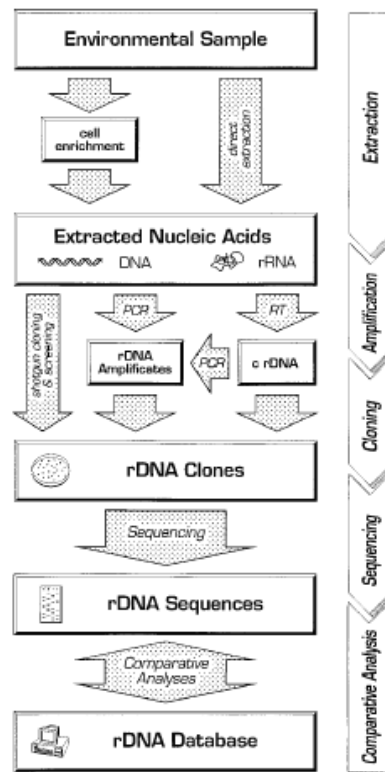


Fig. 1.3.1.2. Differenti possibilità di caratterizzare campioni ambientali mediante analisi comparative delle sequenze di rDNA. RT: trascrittasi inversa (da Amann *et al.*, 1995).

Dal punto di vista prettamente quantitativo, la popolazione batterica *in-situ* può essere monitorata per mezzo della *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) e dalla *Catalyzed reported deposition* (CARD-FISH) (Amann *et al.*, 1995). Queste ultime tecniche sono diventate uno strumento fondamentale per lo studio dell'Ecologia Microbica (Pernthaler *et al.*, 2001). Sulla base delle sequenze analizzate e collezionate, sonde

oligonucleotidiche (normalmente 15-20 nucleotidi) possono essere chimicamente sintetizzate e disegnate. Queste sonde possono essere sintetizzate per definire entità tassonomiche quali specie, generi, famiglie, ordini e perfino domini. Le sonde permettono di classificare rapidamente le cellule batteriche appartenenti ai maggiori gruppi e di comprenderne il ruolo ecologico che questi svolgono (Amann and Ludwig, 2000; Wagner *et al.*, 2003). Negli ultimi anni, la metodologia che ha trovato un'ampia diffusione nello studio della diversità in campioni naturali, è basata sull'utilizzo di sonde molecolari oligonucleotidiche rRNA specifiche, che si legano a segmenti del RNA e impartiscono alla cellula una fluorescenza rilevabile in microscopia ad epifluorescenza (Giovannoni *et al.*, 1988; Delong *et al.*, 1989; Amann *et al.*, 1990b). Questa tecnica molecolare permette in questo modo di distinguere i diversi gruppi all'interno di un campione precedentemente concentrato su un filtro, consentendo quindi una descrizione della diversità delle comunità microbiche senza modifiche rispetto alla situazione *in situ*. Tale tecnica ha permesso di caratterizzare la comunità batterica e di seguirne le dinamiche temporali di specifici ceppi batterici in condizioni sia naturali che sperimentali (Alfreider *et al.*, 1996; Llobet-Brossa *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 1998; Glockner *et al.*, 1999; Simon *et al.*, 1999; Pernthaler *et al.*, 2001). L'utilizzo di questa tecnica, va sottolineato, permette l'identificazione dei singoli componenti di comunità microbiche, ma non fornisce alcuna indicazione riguardo le caratteristiche fisiologiche e metaboliche o, in altri termini, sull'effettivo ruolo svolto dalle diverse classi di microrganismi presenti.

La caratterizzazione della comunità può procedere attraverso l'utilizzo di sonde generali per grandi raggruppamenti, come ad esempio, *Bacteria* (EUB338) ed *Archea* (ARCH915), per poi passare a sottoclassi come *Alpha-Proteobacteria* (ALF1b), *Beta-Proteobacteria* (BET42a), *Cytophaga-Flavobacteria* (CF319) e *Actinobacteria* (HGC 69a) (Amann *et al.*, 1995).

In alcuni casi, la mancanza di segnale, non deve necessariamente essere interpretata come l'assenza dell'organismo bersaglio nel campione. L'applicazione di questa metodica, può presentare molti limiti: 1) spesso molti batteri infatti, in ambienti acquatici, possono essere poco attivi e quindi contenere un basso numero di ribosomi; 2) le sonde possono presentare delle difficoltà di penetrazione all'interno della cellula o il sito bersaglio del r-RNA potrebbe non essere accessibile alla sonda. In questi casi, poiché l'intensità della fluorescenza dipende dalla concentrazione della sonda, il segnale dell'ibridazione potrebbe essere più basso del limite di rilevabilità o confondersi nel *background*. Per

ovviare a queste limitazioni, recentemente è stato proposto un nuovo protocollo che permette l'amplificazione del segnale per via enzimatica: la CARD-FISH. Pernthaler e colleghi nel 2002 hanno proposto questa tecnica per una corretta identificazione dei batteri di piccole dimensioni sia in ambiente marino planctonico che bentonico. Questo procedimento si basa sull'impiego di sonde oligonucleotidiche alle quali, invece che un fluorocromo, viene legata una perossidasi estratta dal rafano (*horseradish peroxidase*-HRP), e su un sistema di amplificazione del segnale mediato dalla tirammide marcata, un composto fenolico, che lega un fluorocromo. La reazione dell'HRP con il perossido di idrogeno e con la porzione fenolica della tirammide marcata attiva la tirammide che è in grado di legarsi covalentemente ai residui di tirosina presenti nelle proteine della parete batterica delle cellule bersaglio; l'HRP, catalizza la dimerizzazione di un ampio numero di molecole di tirammide marcate, favorendo la deposizione di composti fluorescenti in abbondante numero sulla parete della cellula bersaglio. Tale processo amplifica la fluorescenza su tutta la parete cellulare (Pernthaler *et al.*, 2002). Anche questa tecnica presenta comunque delle complicanze rappresentate dalle notevoli dimensioni delle sonde HRP. Per questo motivo la permeabilizzazione della parete cellulare rappresenta un passaggio cruciale, in quanto deve permettere il passaggio all'interno della cellula di queste grosse molecole senza provocarne la lisi.

2. METODI

2.1 Abbondanza batterica totale

L'abbondanza batterica (BAB) per le acque del mare Adriatico (Cap. 3.1) e per i biofilm (Cap. 3.2, 3.3) è stata determinata per mezzo della microscopia ad epifluorescenza dopo colorazione con il colorante 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) alla concentrazione finale di $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Porter e Feig, 1980). Il DAPI è un colorante che si lega al DNA cellulare rendendo fluorescenti le cellule, che in tal modo possono essere distinte dal particolato inerte o da organismi diversi dai batteri. Il DAPI è un colorante specifico che si lega esclusivamente alla doppia elica del DNA, soprattutto alle porzioni ricche di adenina e timina, determinando una fluorescenza blu in seguito ad eccitazione sotto luce ultravioletta.

Successivamente al prelievo, i campioni in tre repliche, sia per le comunità batteriche del mare Adriatico, sia per le comunità batteriche associate al biofilm, sono stati fissati in formaldeide (concentrazione finale del 2%), incubati per 5 minuti e filtrati su filtri neri di policarbonato $0.2\text{-}\mu\text{m}$ (porosità $0.2 \mu\text{m}$, diametro 25 mm, Nuclepore Corporation, USA). Dopo un'incubazione di 4 minuti al buio il filtro è stato poggiato su un vetrino con olio non fluorescente (R.P. Cargille Lab) coperto da un coprioggetto e conservato a -20°C fino al momento dell'osservazione microscopica. La conta è stata effettuata con un microscopio ad epifluorescenza DM LB 30 dotato di lampada a vapori di mercurio (HBO 103W), filtro dicroico UV, oculare con ingrandimento 10x ed obiettivo ad immersione 100x. Per il calcolo dell'abbondanza batterica si è proceduto alla conta di un minimo di 300 cellule.

2.2 CARD - FISH per l'analisi della comunità batterica

La dinamica di specifici gruppi batterici è stata seguita mediante la tecnica *Catalyzed Reporter Deposition* (CARD-FISH), in accordo con il protocollo di Pernthaler *et al.* (2002) e Fazi *et al.*, (2008). 50 ml di campione sono stati prelevati subito dopo il campionamento, trasferiti in Falcon sterili ed immediatamente fissati con formalina (concentrazione finale 2%). Successivamente sono stati filtrati su filtri $0.2\text{-}\mu\text{m}$ (porosità $0.2 \mu\text{m}$, diametro 47 mm, Nuclepore Corporation, USA) in tre repliche per ogni campione. Inizialmente sono state utilizzate le sonde EUB338 I-III marcate con HRP specifiche per il dominio dei

Bacteria. In seguito sono stati identificati diversi ceppi all'interno della comunità batterica usando sonde RNA più specifiche (Tab. 2.2.1.1).

Organismo bersaglio	Nome della sonda	Sequenza (5' - 3')
<i>Bacteria</i>	EUB 338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT
<i>Bacteria</i>	EUB 338 II	GCAGCCACCCGTAGGTGT
<i>Bacteria</i>	EUB 338 III	GCTGCCACCCGTAGGTGT
<i>α-Proteobacteria</i>	ALF 968	GGTAAGGTTCTGCGCGTT
<i>γ-Proteobacteria</i>	GAMMA 42a	GCCTTCCCACATCGTTT
<i>Cytophaga-Flavobacteria</i>	CF 319a	TGGTCCGTGTCTCAGTAC
<i>Actinobacteria</i>	HGC 69a	TATAGTTACCACCGCCGT

Tab. 2.2.1.1. Sonde specifiche utilizzate in questo studio.

I filtri sono stati tagliati in condizioni di sterilità e quindi numerati sulla corona esterna con una matita morbida. Per ridurre la perdita di cellule durante i successivi trattamenti le sezioni sono state disposte su un vetrino e ricoperte di agarosio allo 0,2% (sterilizzato in autoclave), previamente portato ad ebollizione. Il vetrino è stato quindi posto in un termostato a 37 °C per almeno 10 minuti, fino a completa solidificazione dell'agarosio. Successivamente, tutte le sezioni, sono state trasferite in una capsula Petri contenente una soluzione di EtOH al 96% per 1 minuto e quindi lasciate asciugare su carta assorbente.

Questa tecnica richiede la penetrazione, all'interno della cellula *target*, di sonde oligonucleotidiche di grandi dimensioni; per questo motivo sono necessari trattamenti enzimatici di permeabilizzazione della parete cellulare mediante due enzimi: il Lisozima ([62970, Fluka], 20 mg/ml) e la Proteinasi K. Il primo è un enzima che ha la capacità di scindere il legame β -1,4 tra l'N-acetilglucosammina e l'acido N-acetilmuramico del peptidoglicano, componente della parete cellulare (Brock *et al.*, 2003); la Proteinasi K, enzima isolato da *Tritirachium album*, è una serin-proteasi ad ampio spettro utilizzata in generale per digerire le proteine cellulari ed in particolare le nucleasi.

La soluzione contenente il lisozima, è stata preparata all'interno di una provetta da 2 ml con: 20 mg di lisozima, 200 μ l di EDTA 0.25M, 200 μ l di Tris-HCl 1 M e 1600 μ l di acqua Milli-Q (le soluzioni e l'acqua Milli-Q erano state preventivamente sterilizzate in

autoclave). Mentre la soluzione contenente Proteinasi K è stata preparata in una Falcon da 15 ml con: 18 µl di soluzione standard in 6 ml di Tris-HCl EDTA (TE). La soluzione standard della Proteinasi K (P 2308 34U/mg) è stata preparata in precedenza con la seguente relazione: 1mg / 1ml MQ e poi conservato a -20 °C; il Tris-HCl EDTA (TE), invece, è stato preparato con: 100ml di MQ, 0.121g di Tris 10 Mm e 0.037g, EDTA 1Mm e poi portato a pH 8.

Tutte le sezioni sono state quindi poste all'interno della provetta contenente la soluzione di lisozima e messe ad incubare in un termostato a 37 °C per 60 minuti. Terminata l'incubazione le sezioni sono state trasferite in acqua MQ per circa 1 minuto e subito dopo inserite nella soluzione contenente Proteinasi K per 25 minuti in un termostato a 37 °C. Terminata questa fase, è iniziata la procedura di inattivazione delle perossidasi endogene, che, interferendo con l'HRP legata alla sonda nel processo di attivazione della tirammide, potrebbero causare delle distorsioni nell'amplificazione del segnale. Le sezioni, dopo il lavaggio con acqua MQ sono state trasferite in una capsula Petri contenente 10 ml di HCl 0.01M per 10 minuti. Al termine di questo procedimento le sezioni sono state nuovamente sciacquate per un minuto con acqua MQ, un minuto in etanolo al 96% e infine lasciate asciugare su carta assorbente.

A tale fase è seguita quella di ibridazione che prevede la preparazione di un tampone in una Falcon da 50 ml con 3600 µl di NaCl 5 M, 400 µl di Tris/HCl 1M, 2 g di Dextran sulfate, 7000 µl di Formammide, 7000 µl di acqua MQ, 2000 µl di Blocking reagent 10% e 40 µl di Sodio dodecil-solfato 10%.

In una provetta da 0.5 ml sono stati aggiunti, lavorando sotto cappa, 200 µl di tampone di ibridazione e 2 µl di una soluzione contenente la sonda a concentrazione finale di 50 ng/µl. Per la sottoclasse dei *Gamma-Proteobacteria*, la soluzione contenente la sonda GAM 42a HRP-marcata è stata utilizzata contemporaneamente alla sonda BET 42a non marcata (inibitore competitivo). Per questa sonda deve essere usato un competitore non marcato in quanto i target nucleotidici delle due sonde, BET 42a e GAM 42a, hanno una sequenza molto simile e il competitore non marcato garantisce un più corretto appaiamento tra la sonda e la specifica sequenza bersaglio. Le sezioni con la soluzione contenente le sonde specifiche sono state incubate a 37 °C per circa 24 ore, sotto costante rotazione.

Successivamente è stato preparato un tampone di lavaggio, allo scopo di rimuovere la Formammide e stabilizzare l'appaiamento delle sonde. Il tampone di lavaggio è costituito

da: 700 µl di NaCl 5M, 1000 µl di Tris/HCl 1M, 500 µl di EDTA 0.25M, 50 µl di SDS (10%) ed acqua MQ fino a un volume finale di 50ml.

Le sezioni prelevate sono state collocate nella Falcon da 50 ml contenente il tampone di lavaggio precedentemente riscaldato a 37 °C per circa 30 minuti. La Falcon contenete le sezioni è stata messa in un termostato a 37 °C per 20 minuti. Successivamente le sezioni sono state prelevate rimuovendo l'eccesso di liquido con carta assorbente, collocate all'interno di un beker contenente 10ml di 1xPBS e posizionate su una piastra agitante alla velocità di 160 mov/min per 15 minuti a temperatura ambiente.

L'eccesso di liquido è stato nuovamente rimosso con carta assorbente e le sezioni sono state trasferite in una provetta da 0.5 ml contenente 1 parte di tirammide marcata con il fluorocromo fluoresceina (FLU), e 1000 parti di una soluzione contenente il tampone di amplificazione. Questo tipo di fluorocromo è in grado di emettere fluorescenza nella lunghezza d'onda del verde (da 450 a 490 nm). Il tampone di amplificazione è composto da: 5 ml di 10xPBS, 20 ml di NaCl 5M, 0.5 ml di Blocking reagent, 5 g di Dextran sulfate e acqua MQ fino al volume finale di 50 ml, mentre l'allestimento del substrato fluorescente richiede la preparazione di più soluzioni in più passaggi pertanto viene qui di seguito schematizzato:

- soluzione A: 200 µl 1xPBS + 1 µl H₂O₂
- soluzione B: 1200 µl di tampone di amplificazione + 6 µl di soluzione A
- soluzione C: 1000 µl di soluzione B + 1 µl di tirammide

Le sezioni sono state quindi trasferite in un termostato a 37 °C per 15 minuti, al buio e sotto rotazione, in modo tale che la tirammide, attivata esclusivamente dalla perossidasi legata alla sonda (HRP), potesse legarsi alle proteine della parete. In seguito le sezioni sono state poste prima in un beker contenente 10ml di 1xPBS e successivamente all'interno del beker su un piano agitante alla velocità di 160 mov/min per 30 minuti a temperatura ambiente ed al buio, poi sciacquate in acqua MQ, successivamente in EtOH al 96% e infine sono state lasciate asciugare al buio su carta assorbente.

Le sezioni, sistemate sui vetrini, sono state saturate ognuna da una goccia di olio da immersione Vectashield with DAPI (Vector Laboratories Inc) e protette dai vetrini coprioggetto. I campioni sono stati conservati al buio a -20 °C fino al momento della lettura al microscopio effettuata tramite i filtri Leica A (DAPI) e Leica 13 (FLU).

2.3 Analisi delle sequenze geniche per il 16S rDNA

Per l'analisi qualitativa della diversità microbica ad un maggiore livello tassonomico, si è proceduto al sequenziamento dei geni 16S rRNA. Sono state generate per i campioni prelevati in Mare Adriatico 4 librerie per un totale di 230 cloni, due per i campioni della stazione di superficie in costa e due per la stazione più profonda al largo per il mese di Marzo e Novembre. Il DNA totale è stato estratto ed isolato, previa filtrazione (1L), dai filtri in policarbonato 0.2µm (porosità 0.2 µm, diametro 47 mm, Nuclepore Corporation, USA) in accordo con i protocolli cloroformio-fenolo-isoamilalcool di Zhou *et al.*, (1996) e Pizzetti *et al.*, (2011). I geni per il 16S rRNA sono stati amplificati usando dei primers batterici generali GM3 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3') e GM4 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3'). Ogni mix di PCR con un volume di 50 µl conteneva 0.3 mg ml⁻¹ di albumina di siero bovino (BSA) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Germany), un buffer di reazione 1x, 0.25 mM di deossinucleotide trifosfato (dNTP) (TaKaRa Bio Inc., Japan), 0.5 µM di ogni primers (Biomers, Ulm, Germany), 0.02 U µl⁻¹ di *Taq* polimerasi (TaKaRa Bio Inc., Japan) e 1 µl di DNA. L'amplificazione è avvenuta con un termociclatore (Perkin-Elmer AmpGen 2400) con il seguente protocollo: denaturazione a 94°C per 5 min seguiti da 25 cicli 1 min di denaturazione a 94°C, annealing a 48°C per 1 min, allungamento a 72°C per 1 min ed elongazione finale a 72°C per 10 min. I prodotti di PCR sono stati determinati con il gel di elettroforesi con agarosio 1% (Biozym LE agarose; Biozym, Oldendorf, Germany). Frammenti ottenuti dal gel di agarosio 1.5% sono stati estratti e purificati con il kit di estrazione per gel QIAquick (QIAGEN, Hilden, Germany) prima del clonaggio eseguito con il kit di clonaggio TOPO TA Cloning (Invitrogen, Gröningen, Netherlands), in accordo con il protocollo fornito dalla casa produttrice. I vettori ricombinanti sono stati trasformati in cellule competenti di *E.coli* TOPO One Shot Mach1-T1 mediante shock termico; successivamente sono state piastrate e incubate per una notte a 37 °C su terreno e in seguito prelevate. Gli inserti dei cloni sono stati amplificati mediante PCR usando primer M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') e M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC- 3'). Le condizioni di reazioni sono state: denaturazione a 94°C per 5 min seguiti da 30 cicli di denaturazione di 1 min a 94°C, annealing at 57°C for 1.30 min, allungamento at 72°C per 3 min e allungamento finale a 72°C per 15 min. Tutti i prodotti di PCR sono stati purificati usando il kit *mi*-PCR Purification Kit (Metabion, Germany). Le reazioni di sequenziamento sono state eseguite usando il primer 907 RM (5'-

CCGTCAATTCMTTTGAGTTT-3') (Biomers, Ulm, Germany) per ottenere sequenze parziali con una lunghezza media di 900 bp. Tutte le sequenze ottenute sono state controllate con il programma FinchTv (www.geospiza.com), allineate con il database Silva (<http://www.arb-silva.de>; Pruesse *et al.*, 2007) e le analisi filogenetiche sono state eseguite con il software ARB (Ludwing *et al.*, 2004). Per una più accurata analisi filogenetica dell' rDNA sono state incluse solamente le sequenze con più di 1200 nucleotidi. La ricostruzione degli alberi filogenetici si è basata sul metodo del Maximum likelihood (ML) con filtri di conservazione di posizione al 50% per i principali gruppi considerati.

2.4 Attività cellulare (FISH-BrdU)

La necessità sempre crescente di approfondire le conoscenze sulla relazione tra funzionalità e filogenesi, ha permesso che molte analisi si concentrassero sullo studio dello stato di attività di singoli ceppi batterici. A tal fine le tecniche di ibridazione *in situ* (FISH) sono state utilizzate in combinazione con le tecniche per la stima dei tassi di divisione cellulare.

Recentemente è stato proposto di utilizzare l'incorporazione di Bromodeossiuridina (BrdU), come metodo alternativo non radioattivo per misurare il tasso di crescita batterica. La BrdU, un analogo della timidina, precursore nucleosidico della base azotata pirimidinica Timidina, può essere facilmente incorporato nel DNA al posto del naturale precursore per la somiglianza nella struttura, in quanto le due molecole differiscono solo per la presenza di un residuo di Bromo al posto del gruppo metilico (-CH₃) legato al carbonio in posizione 5 dell'anello della pirimidina (Hamasaki *et al.*, 2004). La sua presenza può essere visualizzata tramite l'utilizzo di un anticorpo (anti-BrdU).

La frequenza delle cellule sintetizzanti DNA nelle differenti popolazioni è stata determinata mediante incubazione di Bromodeossiuridina (BrdU) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) e di timidina (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany) in accordo con il protocollo di Pernthaler e colleghi (2005). Dopo aver raccolto e incubato (2h) con BrdU a temperatura ambiente (20 µM concentrazione finale) i campioni di acqua (10 ml) si è proceduto a fissarli in formalina (concentrazione finale al 2%) e dei sub-campioni sono stati successivamente filtrati su filtri di policarbonato (0.2 µm, diametro 47 mm Nuclepore). Successivamente delle sezioni sono state fissate con agarosio 0.2% al fine di evitare perdita di cellule durante i successivi passaggi. Per la fase di permeabilizzazione

della parete si è utilizzata: una soluzione contenente Lisozima ([62970, Fluka], 20 mg/ml) (20 mg di lisozima, 200 µl di EDTA 0.25 M, 200 µl di Tris/ HCl 1 M e 1600 µl di acqua MQ), e una soluzione contenente Proteinasi K, 18 µl di soluzione standard in 6 ml di Tris-HCl EDTA (TE). La soluzione standard della Proteinasi K (P 2308 34U/mg) è stata preparata in precedenza con la seguente relazione: 1mg / 1ml MQ e poi conservato a -20 °C; il Tris-HCl EDTA (TE), invece, è stato preparato con: 100ml di MQ, 0.121 g di Tris 10 Mm e 0.037g di EDTA 1Mm e poi portato a pH 8. Tutte le sezioni sono state quindi posizionate all'interno della provetta contenente la soluzione di lisozima e messe ad incubare in un termostato a 37 °C per 60 minuti; terminata l'incubazione le sezioni sono state trasferite in acqua Milli-Q e subito dopo inserite nella soluzione contenente Proteinasi K per 25 minuti in un termostato a 37 °C. Il passaggio successivo è stato quello dell'inattivazione delle perossidasi endogene in HCl 0.01M per 10 minuti e al termine di questo ultimo procedimento le sezioni sono state lavate per cinque minuti con 1xPBS.

Le sezioni hanno poi subito un trattamento enzimatico con gli enzimi di restrizione che tagliano in modo specifico la doppia elica del DNA Exonuclease III (estratto da *E. Coli*), e HAE III (estratto dal batterio *Haemophilus aegyptius*), con lo scopo di permettere all'anticorpo legante la perossidasi HRP di raggiungere la bromodeossiuridina incorporata nel DNA. Le sezioni sono state inserite all'interno di una provetta da 1 ml contenente 2 µl di HAE III (Sigma R 5628, concentrazione finale 20 U/ml), 0.5 µl di Exonuclease III (Sigma E 1131 50 U/mg, concentrazione finale 50 U/mg), 900 µl di MQ e 100 µl di tampone per le nucleasi. Tale tampone era stato preparato aggiungendo 5 ml di Tris-HCl 1M, 4.5 ml di MQ e 500 µl di cloruro di magnesio (MgCl). In seguito le provette sono state incubate a 37 °C per 30 minuti.

Al termine della digestione enzimatica i filtri sono stati trasferiti all'interno di una provetta da 0.5 ml contenente 10 µl di anticorpi anti-BrdU leganti la perossidasi (Anti-BrdU-HRP-FAB fragment Roche, concentrazione finale 0.75 U/mg), 20 µl di 10XPBS, 20 µl di blocking reagent e 150 µl di MQ. Le provette sono state incubate a 37 °C per 2 ore. Successivamente sono stati effettuati dei lavaggi prima di procedere all'amplificazione del segnale: le sezioni sono state trasferite in una provetta da 0.5 ml contenente 1 parte di tirammide marcata con fluorescina e 1000 parti di una soluzione contenente il tampone di amplificazione (5 ml di 10xPBS, 20 ml di NaCl 5M, 0.5 ml di Blocking reagent, 5 g di Dextran sulfate e acqua MQ fino al volume finale di 50 ml) ed incubate a 37 °C per 15 minuti. Si è proceduto poi ai lavaggi ed in seguito le sezioni,

sono state sistemate sui vetrini, con una goccia di olio da immersione Vectashield con DAPI (Vector Laboratories Inc) e osservate al microscopio.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Caratterizzazione della comunità batterica in un ambiente costiero soggetto ad un gradiente di trofia

3.1.1 Sito di studio e campionamento

Il Mar Adriatico è un ecosistema semi-chiuso caratterizzato da una estesa piattaforma continentale e dalla peculiarità di ricevere nella sua zona settentrionale, significativi apporti di acqua dolce che marcatamente ne aumentano la produttività rispetto alle condizioni oligotrofiche del Mar Mediterraneo (Puddu *et al.*, 1998). Il bacino dell'Adriatico è quindi fortemente influenzato nelle caratteristiche biochimiche dall'apporto di sostanze organiche, inorganiche e nutritive dai fiumi, che scaricano in entrambi i versanti un'ingente quantità di acqua dolce (circa 6000 m³/s) condizionando anche la circolazione delle acque. Nella porzione nord del Mare Adriatico il 51% delle acque dolci deriva dal fiume Po (Degobbis & Gilmartin, 1990). La circolazione dell'Adriatico è per lo più guidata da forze termoaline, causate da apporti di acqua dolce, che producono uno scorrimento di acque di superficie meno dense rispetto a quelle più dense di profondità (Artegiani *et al.*, 1996). I condizionamenti dei fiumi quindi stimolano la stratificazione salina, modificando la circolazione e gli scambi tra la parte nord e centrale del bacino contribuendo così ad una variabilità spaziale e temporale dei nutrienti e della biomassa fitoplanctonica (Degobbis *et al.*, 2000). In relazione a queste diverse condizioni trofiche, si osserva nella zona poco profonda dell'Adriatico Settentrionale un ciclo di produzione primaria che è notevolmente influenzato dalle immissioni fluviali di nutrienti, rispetto all'Adriatico Centrale e Meridionale caratterizzati da una bassa produzione primaria. Rispetto alle acque costiere, le acque in mare aperto presentano invece caratteristiche oligotrofiche; la coesistenza di condizioni costiere eutrofiche e in mare aperto oligotrofiche, implica la presenza di un gradiente trofico dipendente dalle interazioni tra i processi biogeochimici, la circolazione e la struttura della colonna d'acqua del bacino (Legovic' *et al.* 1994; Krstulovic' *et al.* 1997). Il campionamento è stato svolto in Adriatico Settentrionale, a largo delle coste di Ancona, durante due campagne oceanografiche nei mesi di Marzo e Novembre 2009, lungo un transetto costa-largo a bordo della Nave Oceanografica del CNR "G.Dallaporta". Alle campagne hanno preso parte ricercatori dell'IRSA-CNR (Istituto di

Ricerca sulle Acque-Consiglio Nazionale delle Ricerche di Roma) e dell' ISMAR-CNR (Istituto di Scienze Marine-Consiglio Nazionale delle Ricerche di Venezia).

I campioni d'acqua sono stati prelevati in 4 stazioni poste rispettivamente a una distanza di 6 (S1), 13 (S2), 28 (S3) e 37 (S4) miglia dalla costa. Si è proceduto alla determinazione dei profili verticali di temperatura, salinità, pH, ossigeno disciolto, torbidità, fluorescenza ed irradianza PAR (radiazione fotosinteticamente attiva) per mezzo della sonda CTD (*Idronaut*). In base al profilo ottenuto, ed in particolare, ai dati relativi al PAR (spettro elettromagnetico compreso tra 400 e 700 nm) sono state determinate le diverse quote di campionamento.

Nella Tab. 3.1.1.1 sono riportate le coordinate longitudinali e latitudinali dei quattro punti, i dati relativi al PAR e le rispettive quote di campionamento. I ricercatori dell'ISMAR-CNR hanno raccolto i dati relativi alle caratteristiche chimico-fisiche, al fitoplancton, al batterioplancton e allo zooplancton.

Staz.	Lat.	Long.	% PAR Marzo	% PAR Novembre	Prof. Marzo	Prof. Novembre
S1	43° 44,728	13° 23,960	100	100	0	0
			50	48	-5	-2
			25	18	-10	-5
			3	6	-17	-10
				2		-18
S2	43° 48,250	13° 31,414	100	100	0	0
			30	47	-5	-5
			16	14	-10	-20
			10	5	-20	-35
			1	2	-40	-45
S3	43° 56,985	13° 49,003	N.D.	100	N.D.	0
				44		-5
				9		-25
				3		-40
				1		-65
S4	44° 01,682	13° 59,718	100	100	0	0
			50	38	-5	-5
			10	8	-20	-25
			1	3	-40	-40
			0,8	0,6	-65	-65

Tab. 3.1.1.1 Riferimenti latitudinali e longitudinali delle stazioni di campionamento.

3.1.2 Parametri chimico-fisici

Nel mese di Marzo si sono registrati valori di salinità compresi tra valori di 34.0 nella stazione costiera (S1) e di 38.4 nella stazione di mare aperto (S4). Per la temperatura sono stati registrati valori compresi tra 10.5 °C (S1) e 12.0 °C nella stazione più al largo (S4). La stazione di mare aperto è caratterizzata da una forte instabilità e una più alta salinità rispetto alla stazione di costa. La concentrazione di sostanza organica particolata (POC) misurata era compresa tra un valore massimo di 104.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ in S1 ed un valore minimo di 70.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ in S4. Per la sostanza organica disciolta (DOC) sono state registrate delle concentrazioni comprese tra 1.496 mg l^{-1} e 1.687 mg l^{-1} rispettivamente nelle stazioni di costa e di largo. I nutrienti sono stati registrati con concentrazioni decrescenti per i composti dell'azoto lungo il transetto costa-largo (14.7 μM e 0.94 μM) e con valori crescenti per il fosforo (da 0.02 μM a 0.05 μM) lungo il transetto costa-largo.

In Novembre, la stazione S1 risulta essere ben differenziata dalle altre stazioni, con valori più bassi per la salinità (con un valore di 36) rispetto a quelli delle altre stazioni più lontane dalla costa (salinità pari a 38). Anche la temperatura risulta essere più bassa con valori medi di 15 °C. La colonna d'acqua per le altre stazioni mostra una omogeneità con valori di salinità massimi pari a 38.5 e una stratificazione intorno ai 35-45m di profondità come indicato anche da un gradiente di temperatura (17.0 °C in superficie e 13.5 °C in profondità). Le concentrazioni del DOC risultano essere decrescenti con valori che vanno da 1.261 mg l^{-1} a 0.943 mg l^{-1} lungo il transetto costa-largo. Il POC mostra dei valori compresi tra 161.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ e 47.0 $\mu\text{g l}^{-1}$, nei campioni costieri e in quelli di largo rispettivamente. Le concentrazioni dei nitrati hanno dei valori decrescenti compresi tra 6.57 μM (S1) a 1.38 μM (S4); per i fosfati sono state misurate concentrazioni con valori minimi nella stazione costiera (0.18 μM) e massimi (0.38 μM) nella stazione di largo.

3.1.3 Abbondanza batterica (BAB)

Nei campioni esaminati l'abbondanza batterica (BAB) ha mostrato valori medi compresi tra $1.01 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ a $1.37 \times 10^6 \text{ cell ml}^{-1}$ rispettivamente nel mese di Marzo 2009 e di Novembre 2009 (fig. 3.1.3.1).

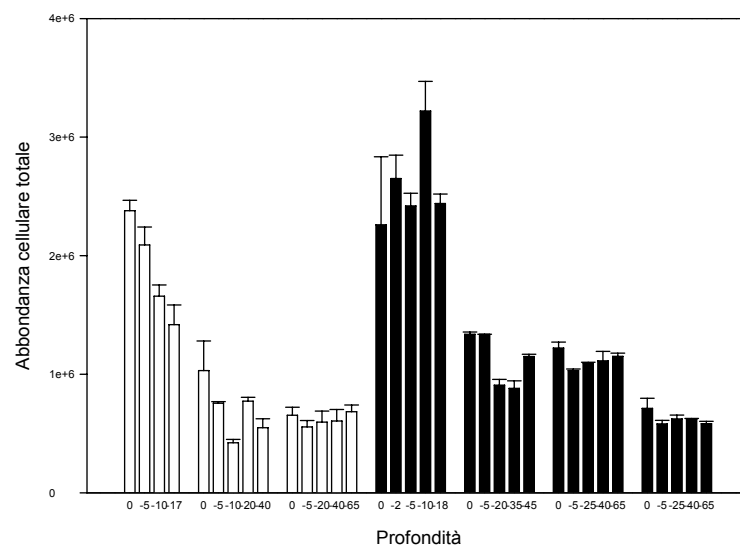


Fig. 3.1.3.1. Abbondanza batterica (cell ml⁻¹) osservata nei mesi di Marzo e Novembre nelle stazioni di campionamento ad ogni profondità.

La stazione (S1) più prossima alla costa, nel mese di Marzo presenta un andamento per la BAB decrescente con dei valori che vanno da un'abbondanza di $2.38 \times 10^6 \pm 8.73 \times 10^4$ cell ml⁻¹ in superficie a $1.42 \times 10^6 \pm 1.66 \times 10^5$ cell ml⁻¹ in profondità. Anche nella stazione S2 si verifica un andamento decrescente con delle abbondanze con un'abbondanza massima in superficie, $1.03 \times 10^6 \pm 2.50 \times 10^5$ cell ml⁻¹, ed un valore più basso di $4.21 \times 10^5 \pm 2.84 \times 10^4$ cell ml⁻¹ sul fondo. La stazione più lontana dalla costa (S4) è quella che presenta, lungo tutta la colonna d'acqua, una minore abbondanza, con valori simili alle diverse profondità.

Nel mese di Novembre l'abbondanza batterica risulta essere maggiore rispetto a quella rilevata in Marzo. La stazione S1, se confrontata con il mese di Marzo, mostra un andamento variabile rispetto alle diverse quote di campionamento con valori che vanno da un massimo di $3.22 \times 10^6 \pm 2.50 \times 10^5$ cell ml⁻¹, riscontrato alla profondità di -10 m, ad un minimo di $2.26 \times 10^6 \pm 5.74 \times 10^5$ cell ml⁻¹ in superficie. Le stazioni S2 e S3 presentano delle abbondanze costanti lungo tutta la colonna d'acqua con un valore medio di $1.12 \times 10^6 \pm 3.26 \times 10^4$ cell ml⁻¹ ed una diminuzione dell'abbondanza rispetto alla stazione costiera. La stazione più al largo è rappresentata da valori di abbondanze ancora più bassi nell'ordine del 10^5 cell ml⁻¹. Risulta difficile comprendere quali siano le principali variabili che possano determinare l'andamento dell'abbondanza batterica, in quanto molteplici sono i fattori che possono incidere sulla comunità microbica. I parametri chimico-fisici che possono intervenire sono individuati nella temperatura, nella salinità e

nella disponibilità di nutrienti (*bottom-up control*). Gli studi di Coveney & Wetzel, (1992) affermano che la crescita della comunità batterica sia limitata dalla quantità e dalla qualità del DOC e dalla disponibilità dei nutrienti, in particolare quelli inorganici. A questi vanno aggiunte la mortalità dovuta a lisi virale (*side in control*) come sostenuto dai lavori di Bratbak e colleghi (1990) e l'effetto del grazing (*top-down control*) operato principalmente dagli eterotrofi nanofalgellati e dai ciliati, individuati come i maggiori predatori dei batteri (Simek *et al.*, 2003). Queste forme di controllo *top down* possono avvenire su scale temporali molto brevi e possono essere strettamente collegate agli effetti di tipo *bottom-up* (Posh *et al.*, 1999).

Lavori di Sander e Kalff (1993) affermano come la crescita batterica sia fortemente legata a delle variazioni di temperatura. Questi dati trovano conferma nelle ricerche di Kirschner e colleghi, (1999) che indicano la temperatura come uno dei principali parametri ecologici in grado di influenzare la crescita della comunità microbica; in questi lavori sono state osservate delle forti correlazioni tra alcuni dei parametri batterici quali l'abbondanza, la produzione e la variazione di temperatura. I dati di bibliografia confermano i risultati osservati nei nostri campioni, in cui ad un incremento della temperatura media si riscontra un aumento nell'abbondanza batterica. Infatti, confrontando le temperature medie misurate nelle due campagne, con valori rispettivamente di, 11.4 ± 0.6 °C per il mese di Marzo e di, 15.9 ± 1.0 °C per il mese di Novembre, corrisponde un aumento anche dell'abbondanza batterica.

I risultati delle correlazioni per le due campagne mostrano inoltre un aumento dell'abbondanza batterica all'aumentare delle concentrazioni dei composti azotati ($r = 0.58$, $p < 0.05$) a conferma di quanto riportato dai lavori di Glockner *et al.*, (1999) e Del Giorgio e colleghi (2000), in cui si pone l'attenzione sulla relazione tra l'aumento dell'abbondanza batterica e la concentrazione dei composti azotati.

A conferma dell'aumento dell'abbondanza batterica in relazione alla differente concentrazione di nutrienti, è stato anche calcolato l'indice TRIX (*trophic index*) che permette l'identificazione dei diversi stati qualitativi delle acque. L'indice mette in relazione tra loro il fosforo totale, la concentrazione di clorofilla, la concentrazione di azoto e l'ossigeno disciolto per arrivare alla definizione dello stato trofico delle acque (Pettine *et al.*, 2007). I valori per quest'indice, sono compresi tra 3.32 e 3.85 per il mese di Marzo e tra 4.16 e 4.90 per il mese di Novembre; tali risultati definiscono lo stato trofico delle acque come oliogotrofiche (Marzo) e mesotrofiche (Novembre). A tali valori corrisponde un aumento medio delle abbondanze batteriche, che quindi

mediamente risultano essere maggiori in acque più ricche di nutrienti. Questo aumento di abbondanza cellulare viene confermato da studi effettuati da Piccin e colleghi (2006) che hanno osservato un incremento delle abbondanze in ambienti a trofia maggiore, fino a raggiungere valori di abbondanza dell'ordine 10^7 in ambienti eutrofizzati. In ultimo, l'abbondanza batterica totale è stata correlata con la concentrazione di clorofilla totale e di carbonio organico particolato (POC) (Fig. 3.1.3.2). I risultati mostrano un aumento dell'abbondanza batterica in relazione all'aumentare della concentrazione di clorofilla ($r = 0.79$, $p < 0.05$) e di sostanza organica particolata ($r = 0.83$, $p < 0.05$).

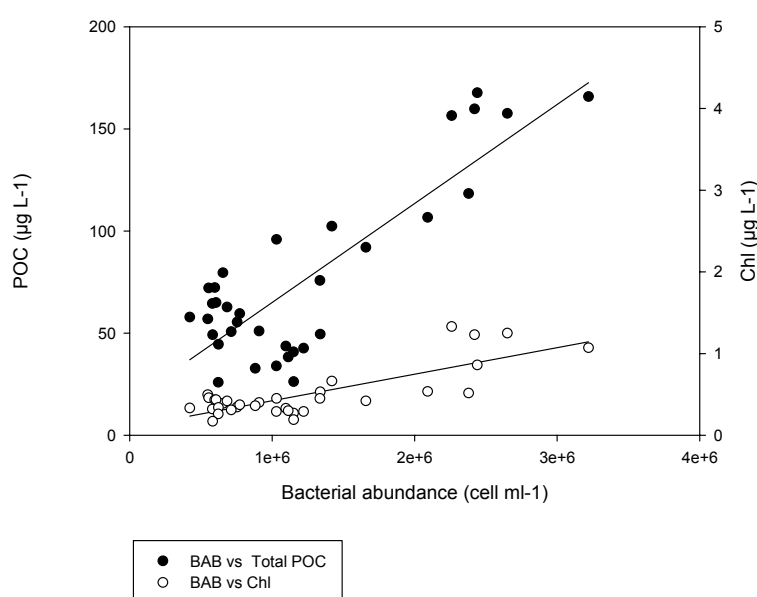


Fig. 3.1.3.2. Correlazione tra le abbondanze (cell/ml) e le concentrazioni di POC ($\mu\text{g/l}$) e di clorofilla totale ($\mu\text{g/l}$).

La percentuale media dei batteri, visualizzati con la tecnica CARD-FISH per il dominio dei *Bacteria*, rispetto al totale delle cellule batteriche marcate con il DAPI, è del $78.7 \pm 4.5\%$ per il campionamento di Marzo; nel mese di Novembre, si ha un aumento della percentuale media delle cellule batteriche per il dominio *Bacteria* con un valore dell' $83.0 \pm 3.9\%$. Le percentuali osservate per il dominio dei *Bacteria* nelle due campagne in Mare Adriatico risultano essere in linea con i lavori presenti in letteratura. Studi sulle comunità microbiche effettuati in Atlantico orientale da Schanttenhofer e colleghi (2009) hanno mostrato delle abbondanze relative medie del $62 \pm 14\%$. Valori più bassi sono stati osservati nel Mare del Nord con percentuali pari al 39% e nell'oceano Antartico con delle percentuali pari al 96% (Glockner *et al.*, 1999).

3.1.4 Abbondanza dei gruppi batterici

La tecnica della CARD-FISH utilizzata in entrambi i campionamenti per i diversi gruppi filogenetici considerati *Alpha-Proteobacteria* (Alpha), *Gamma-Proteobacteria* (Gamma), *Cytophaga-Flavobacteria* (CF) e *Actinobacteria* (HGC) ha mostrato, per il mese di Marzo, come il gruppo più rappresentato nella comunità microbica sia stato quello degli *Alpha-Proteobacteria* ($4.40 \times 10^5 \pm 2.43 \times 10^5$ cell ml⁻¹). I due gruppi, *Cytophaga-Flavobacteria* e *Gamma-Proteobacteria*, con valori di abbondanza di $1.28 \times 10^5 \pm 1.21 \times 10^5$ cell ml⁻¹ e $1.45 \times 10^5 \pm 9.62 \times 10^4$ cell ml⁻¹ rispettivamente, sono gli altri due gruppi più rappresentati nella comunità. Il gruppo degli *Actinobacteria*, risulta essere il meno presente con un valore medio di $4.72 \times 10^4 \pm 6.25 \times 10^4$ cell ml⁻¹ (Fig. 3.1.4.1). Come già descritto precedentemente il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* rappresenta la frazione maggiore della comunità in tutte le tre stazioni e in tutte le diverse profondità campionate nel mese di Marzo. La percentuale per questo gruppo rimane costante lungo tutta la colonna d'acqua nella prima stazione, quella più prossima alla costa (S1), con dei valori medi del $40.3 \pm 1.4\%$. Nella seconda (S2) e nella quarta stazione (S4) si hanno variazioni delle percentuali del gruppo, con una maggiore abbondanza alle profondità intermedie e, un valore massimo del 60% nella stazione più al largo.

Il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* presenta delle percentuali più o meno costanti per tutte le stazioni, con un valore massimo del 19% registrato nella seconda stazione (S2) a poche miglia dalla costa.

Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria*, come quello dei *Gamma*-, non presenta delle grosse variazioni lungo tutta la colonna d'acqua. E' possibile però notare come questo gruppo tenda ad essere favorito nelle quote più superficiali delle differenti stazioni con percentuali medie del 17%.

Gli *Actinobacteria*, gruppo tipicamente in acque dolci, presenta valori che raggiungono il massimo nella stazione più prossima alla costa (9% delle cellule batteriche totali), ed un minimo nel campione prelevato in profondità con una percentuale pari al 1%. Questo risultato conferma come gli apporti di acqua dolce svolgano un ruolo importante nel determinare la composizione della comunità batterica in particolare nella zona costiera.

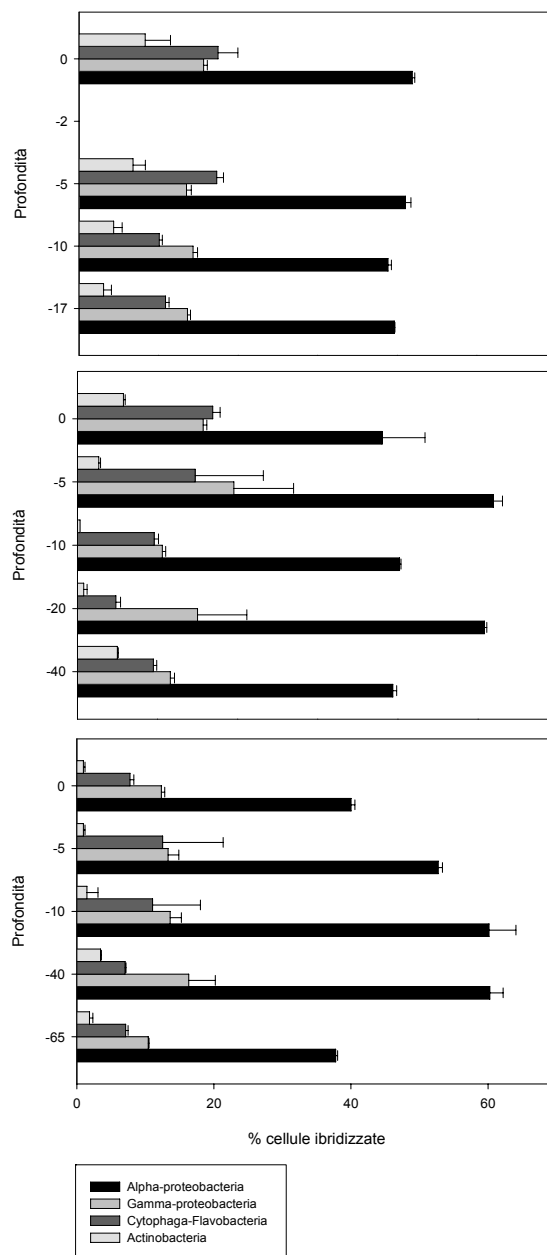


Fig. 3.1.4.1. Percentuali dei gruppi batterici rispetto al totale delle cellule procariotiche nei campioni di Marzo in ogni quota di campionamento. Le barre indicano la deviazione standard.

Il mese di Novembre conferma la predominanza del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* con un'abbondanza pari a $6.93 \times 10^5 \pm 3.99 \times 10^5$ cell ml⁻¹. Differentemente dal campionamento primaverile, in Novembre si presenta una più alta abbondanza del gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* ($3.96 \times 10^5 \pm 3.92 \times 10^5$ cell ml⁻¹) rispetto al gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* ($4.93 \times 10^4 \pm 6.44 \times 10^4$ cell ml⁻¹). Anche nel campionamento di Novembre il gruppo degli *Actinobacteria* risulta avere l'abbondanza minore rispetto agli altri gruppi ($4.07 \times 10^4 \pm 6.57 \times 10^4$ cell ml⁻¹). Anche per il mese di Novembre, come già in precedenza visto nel mese di Marzo, si può osservare una dominanza per il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria*, che rappresenta la frazione maggiore in tutte le stazioni con una percentuale costante in ogni punto del campionamento, con valori medi pari al $51.5 \pm 2.5\%$ (Fig. 3.1.4.2). Differenze tra le due comunità si riscontrano per i gruppi dei *Cytophaga-Flavobacteria* e dei *Gamma-Proteobacteria*. Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* risulta, nella stazione più prossima alla costa, essere una delle frazioni più considerevoli con una percentuale media del $40.5 \pm 2.5\%$; procedendo lungo il transetto costa-largo, si osserva, sempre per questo gruppo, un decremento della percentuale con un valore medio di $18.7 \pm 4.5\%$ per le altre tre stazioni. Questi valori osservati però risultano essere sempre maggiori rispetto al campionamento di Marzo. Il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* nel mese di Novembre subisce una drastica riduzione in percentuale, da un valore medio di abbondanza del 6% nella stazione più prossima alla costa (S1), ad un valore medio del $1.5 \pm 0.9\%$ nelle stazioni più al largo. In ultimo, il gruppo degli *Actinobacteria*, è presente nel campionamento di Novembre con un valore percentuale medio del $5.5 \pm 2.2\%$. Anche nel campionamento di Novembre si osserva, come già visto in Marzo, una diminuzione dell'abbondanza per gruppo filogenetico lungo il transetto costa-largo, con la scomparsa nella stazione al largo. Inoltre, è possibile osservare una diminuzione in valore percentuale in relazione all'aumentare della profondità.

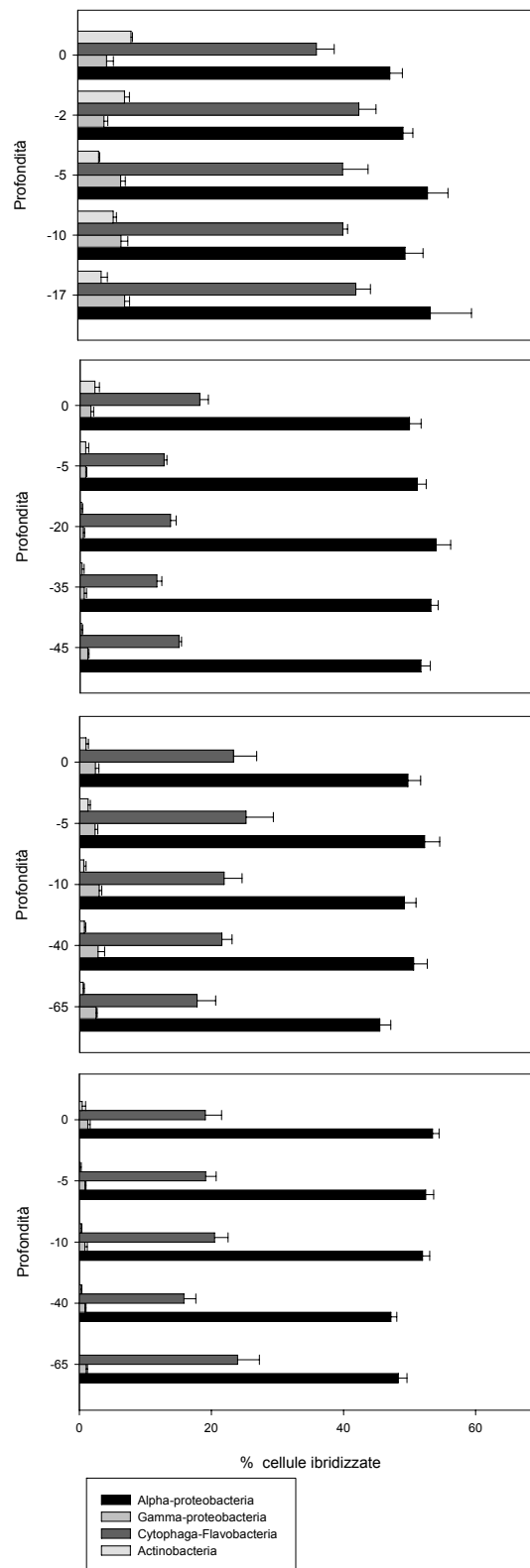


Fig. 3.1.4.2. Percentuali dei gruppi batterici rispetto al totale delle cellule procariotiche nei campioni di Novembre in ogni quota di campionamento. Le barre indicano la deviazione standard.

Confrontando le percentuali dei diversi gruppi filogenetici ottenuti con la tecnica CARD-FISH con la proporzione di cloni ritrovati nelle *clone library* ottenuta sequenziando il gene 16S rRNA (Lupini *et al.*, 2011 in preparazione) (Fig. 3.1.4.3) si osserva una sostanziale similitudine in tutti i siti di studio, ad eccezione dei gruppi degli *Actinobacteria* e dei *Gamma-Proteobacteria*. Per questi due gruppi, nel campionamento di Marzo, si hanno percentuali maggiori di ritrovamento nella *clone-library* rispetto alle percentuali ottenute con la CARD-FISH. Nel campione di Novembre si osserva, invece, una minore presenza dei batteri afferenti al gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* rispetto al numero di sequenze. Le *clone-library* inoltre hanno evidenziato le alte presenze del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria*. Questi risultati mostrano come i quattro gruppi filogenetici analizzati tramite la CARD rappresentano una percentuale rilevante di tutti i ceppi batterici riscontrati dal sequenziamento.

I dati per il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* hanno evidenziato, oltre all'alta abbondanza, con oltre il 30% delle sequenze totali, un'alta variabilità nelle diverse librerie geniche a conferma di quanto riportato dai studi effettuati sempre in ambienti marino-costieri da Cottrell *et al.*, (2000). In particolare nel nostro studio le sequenze appartengono principalmente al genere SAR11 nel mese di Marzo, e agli ordini delle *Rhodobacterales* e *Rhodospirillales* nel mese di Novembre (Lupini *et. al.*, in preparazione).

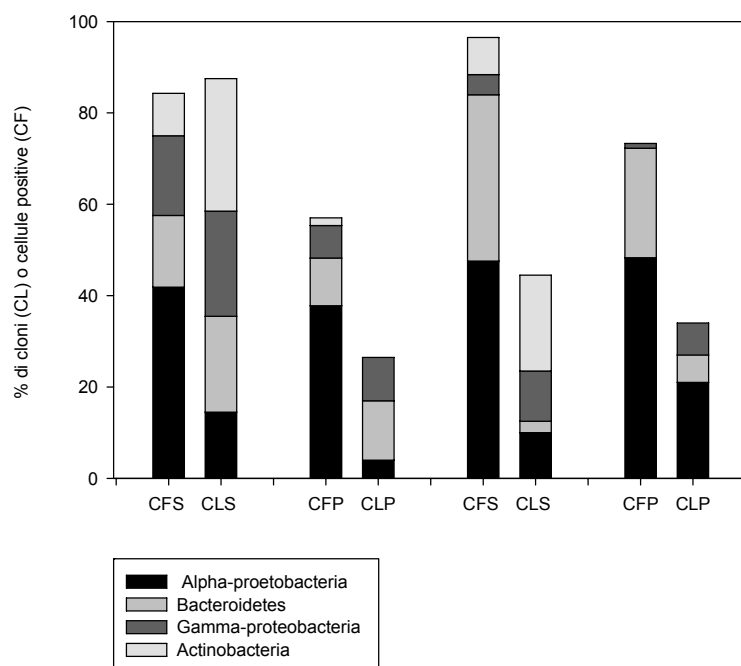


Fig. 3.1.4.3. Percentuali dei gruppi filogenetici ritrovati nelle *clone library* (CL) e analizzate con CARD-FISH (CF) per i mesi di Marzo e Novembre nelle stazioni di superficie (S) e profondità (P) (Lupini *et al.*, 2011, in preparazione).

3.1.5 Struttura comunità batterica

Per esaminare le relazioni tra la struttura della comunità microbica e i parametri ambientali, è stata utilizzata l'analisi delle componenti principali (PCA) (Gauch, 1982) (Fig. 3.1.5.1). I confronti effettuati sono basati sulle percentuali dei diversi gruppi filogenetici e i valori normalizzati delle singole variabili ambientali considerate. Le prime due componenti principali in Marzo spiegano il 75% della variabilità dei dati originali. La prima componente, che spiega per il 57% della variabilità, descrive un ambiente caratterizzato, per la stazione costiera, da un'alta concentrazione dei nutrienti inorganici (NO_3) e del POC e da una bassa salinità, temperatura e concentrazione di fosfato. I gruppi dei *Gamma-Proteobacteria* e degli *Actinobacteria* sono fortemente associati con i campioni costieri e negativamente correlati con la salinità ($r = -0.80$ e $r = -0.84$, $p < 0.05$) e temperatura ($r = -0.83$ e $r = -0.81$, $p < 0.05$) mentre il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* risulta positivamente correlato con POC ($r = 0.86$, $p < 0.05$). Le stazioni S2 e S4, sono associate con la salinità, la temperatura, il DOC e i fosfati. La PCA ha evidenziato una progressiva differenziazione delle tre stazioni, dalla costiera a quelle più al largo seguendo il gradiente di salinità, temperatura e azoto.

In Novembre le prime due componenti spiegano l'84% della variabilità totale. La prima componente (66%) descrive come per il mese di Marzo un ambiente caratterizzato, per la stazione costiera, da un'alta concentrazione di (NO_3), un'alta concentrazione di DOC e POC e una bassa salinità, temperatura e concentrazione di fosfato. I gruppi filogenetici degli *Actinobacteria*, dei *Gamma-Proteobacteria* e *Cytophaga-Flavobacteria*, associati alle stazioni di costa, sono negativamente correlati con la salinità ($r = -0.92, -0.88, -0.94$, $p < 0.05$) e associati ad alta concentrazione di POC e NO_3 . Le stazioni S2, S3 e S4 sono fortemente associate con la temperatura, la salinità e la concentrazione dei fosfati.

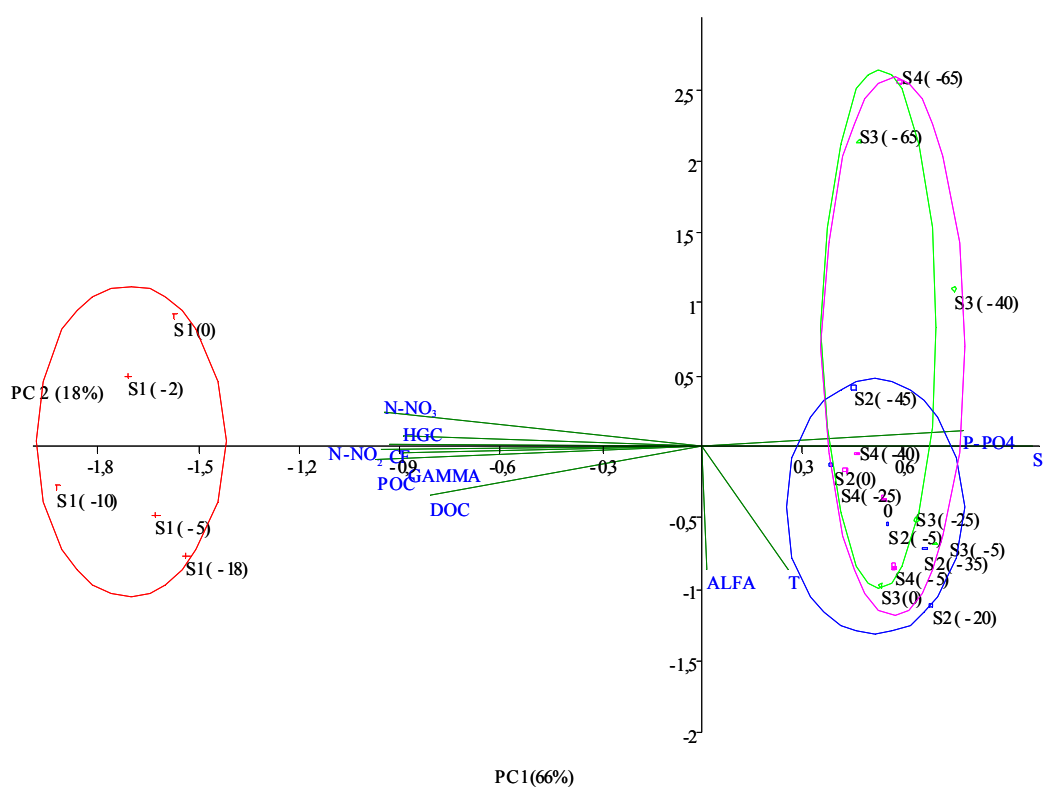
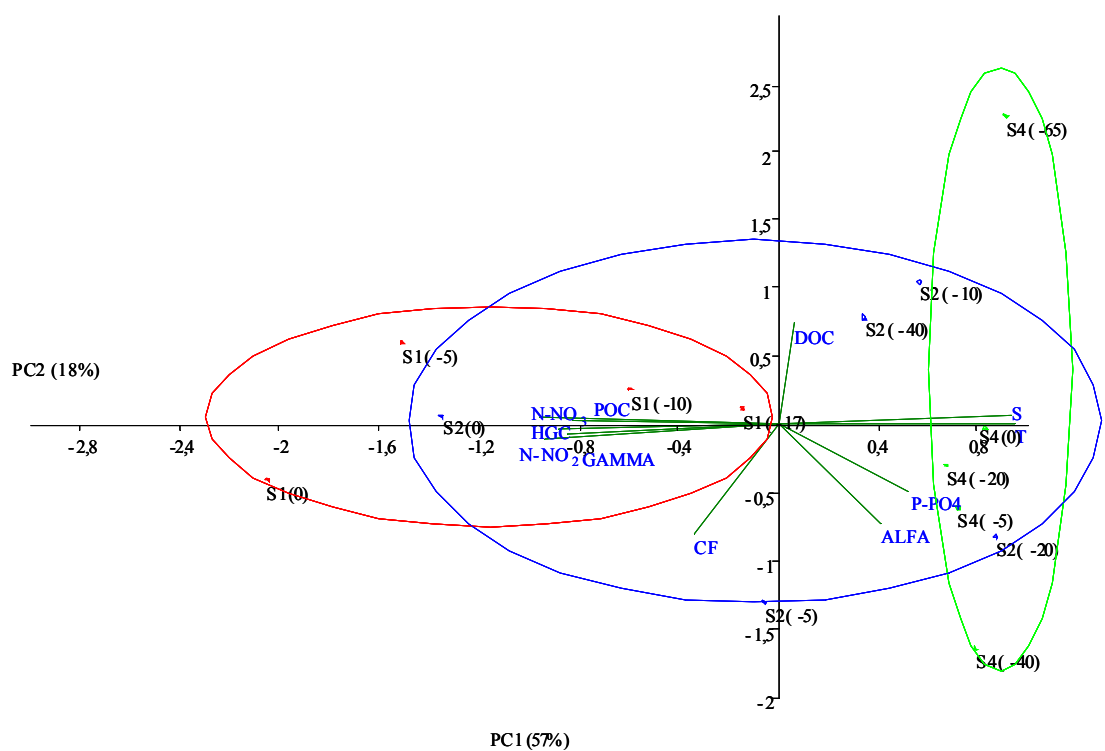


Fig. 3.1.5.1. Analisi delle componenti principali (PCA) eseguita utilizzando i dati chimico-fisici e biologici. Tutti i dati sono stati normalizzati dividendo ogni valore per la deviazione standard di ogni singola variabile.

Cytophaga-Flavobacteria

Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* (*Bacteroidetes*) risulta essere ampiamente distribuito in ambienti bentico-pelagici (Alonso *et al.*, 2007), in acque dolci prossime alla costa (Llobet-Brossa, 1998; Glockner *et al.*, 1999; Kirchman, 2002) e in mare aperto (Simon *et al.*, 1999; Abell e Bowman, 2005; Schattenuhofer *et al.*, 2009). Inoltre questo gruppo è stato ritrovato in ambienti estremi quali “*hydrothermal vents*” oceanici (Sievert *et al.*, 2000), nei sedimenti polari e in quelli costieri (Ravenschlag *et al.*, 2001). Un’alta abbondanza di *Cytophaga* è stata osservata anche in ambienti caratterizzati da acque più fredde (Simon *et al.*, 1999; Abell e Bowman, 2005), a zone con alte concentrazioni di fitoplancton e a zone fotiche (Schattenuhofer *et al.*, 2009). Quindi, questa distribuzione suggerirebbe una preferenza per delle zone con delle condizioni più produttive, anche se spesso il gruppo è stato osservato anche in numero significativo in aree marine oligotrofiche (Schattenuhofer *et al.*, 2009).

Il gruppo risulta essere uno dei più abbondanti negli ambienti acquatici con percentuali variabili a seconda dell’ambiente considerato. Diversi studi hanno osservato abbondanze relative con dei valori minimi del 2% in mar Baltico e con delle abbondanze massime in mare Antartico con il 72% delle cellule totali procariotiche rappresentate (Glockner *et al.*, 1999). Altri lavori di Kirchman e colleghi (2003) hanno osservato una diversa variazione dell’abbondanza cellulare con dei valori compresi tra il 21% e il 29% dell’abbondanza procariotica totale per questo gruppo. I dati ottenuti durante i nostri campionamenti soprattutto nel campionamento di Novembre per i siti più prossimi alla costa, concordano con le distribuzioni descritte precedentemente nei lavori di Kirchman e colleghi (2003) e De Long e colleghi (2006). Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* risulta essere molto abbondante in ambienti soggetti a salinità variabile come le lagune costiere e gli estuari (Piccin *et al.*, 2006; Teira *et al.*, 2008). L’analisi di correlazione effettuata, correlando l’abbondanza batterica del gruppo con i valori di salinità, ha mostrato una relazione negativa all’aumentare della salinità per i campioni di Marzo ($r = -0.86$, $p < 0.05$) e Novembre ($r = -0.94$, $p < 0.05$).

Il gruppo inoltre, costituisce una porzione molto significativa delle comunità microbiche associate a particelle organiche sospese (Simon *et al.*, 2002). A tal fine sono state svolte delle analisi di correlazione, relazionando le abbondanze del gruppo con le diverse concentrazioni del POC, che hanno mostrato un aumento dell’abbondanza all’aumentare della concentrazione di POC (Marzo $r = 0.86$, $p < 0.05$; Novembre $r = 0.94$, $p < 0.05$, Fig.

3.1.5.2). Questo cluster infatti è considerato uno specialista nella degradazione sia della sostanza organica particolata (Fuchs *et al.*, 2000) che DOM (Kirchman, 2002).

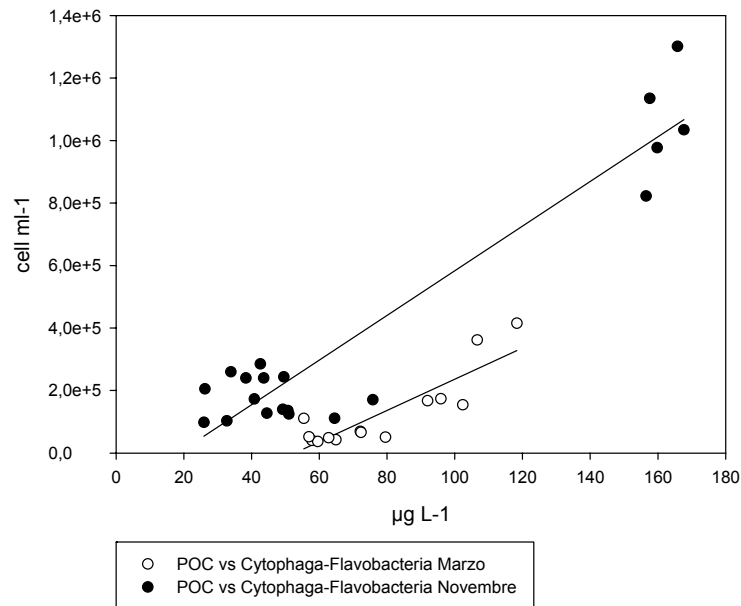


Fig. 3.1.5.2. Correlazione tra il POC ($\mu\text{g l}^{-1}$) e l'abbondanza del gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* (cell ml^{-1}).

Recenti studi hanno anche messo in evidenza la dominanza del gruppo dei *CF* in relazione ad un'alta produzione batterica di carbonio (Teira *et al.*, 2008). A tal proposito sono stati correlati i valori di abbondanza di questo gruppo con la produzione primaria (TPP). Questa analisi ha permesso di osservare un aumento dell'abbondanza di questo gruppo all'aumentare della concentrazione di carbonio prodotto con valori di $r = 0.76$, $p < 0.05$ per il mese di Marzo e $r = 0.70$, $p < 0.05$ per il mese di Novembre.

Actinobacteria

Il gruppo degli *Actinobacteria* ha una distribuzione prettamente legata ad ambienti di acque dolci. Talvolta, a causa dei gradienti di salinità, le lagune e gli estuari offrono dei sistemi naturali per un ampliamento della distribuzione di questo gruppo filogenetico (Holmfeldt *et al.*, 2009). Anche questo gruppo presenta una variabilità nell'abbondanza relativamente all'ambiente considerato; le percentuali possono variare da un valore medio del 20% in ambienti di estuario (Holmfeldt *et al.*, 2009), ad un valore massimo in ambienti di acqua dolce pari a 60% dei batteri totali (Glockner *et al.*, 2000; Sekar *et al.*,

2004; Warnecke *et al.*, 2005; Allgaier & Grossart, 2006).

I risultati ottenuti durante le due campagne, hanno permesso di confermare la scarsa presenza di questo gruppo batterico per gli ambienti marini, così come già evidenziato dagli studi di Pommier e colleghi (2007). Il gruppo degli *Actino-* può rispondere con rapidità ai diversi adattamenti in ambienti di estuario come osservato in studi di Langenheder *et al.*, (2003); Kirchman *et al.*, (2005) e Stevens *et al.*, (2007), rispondendo così velocemente alle forti variazioni di salinità (Warnecke *et al.*, 2004).

I dati ottenuti durante le due campagne hanno messo in evidenza un'abbondanza cellulare di questo gruppo più marcata nei campioni provenienti dalle stazioni più prossime alla costa, in cui avviene mescolanza tra acque dolci e salate, con relativa diminuzione della salinità. Le correlazioni (Marzo $r = -0.84$, Novembre $r = -0.92$, $p < 0.05$) hanno mostrato un decremento dell'abbondanza cellulare del gruppo in relazione all'incremento dei valori di salinità. Questi risultati vengono confermati anche da studi svolti recentemente in Mar Baltico, dai gruppi di Riemann *et al.*, (2008) e di Holmfeldt *et al.*, (2009). L'abbondanza del gruppo degli *Actinobacteria* è stata anche messa in correlazione, come per il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria*, con le concentrazioni di carbonio organico particolato (POC). Le correlazioni ottenute relazionando le abbondanze batteriche e le diverse concentrazioni di POC hanno messo in evidenza un aumento dell'abbondanza del gruppo al crescere della concentrazione di POC nelle acque ($r = 0.83$; $r = 0.88$, $p < 0.05$).

Ulteriori conferme sulla forte associazione tra il gruppo degli *Actinobacteria* e le concentrazioni di POC sono anche rivelate dai lavori di Stepanauskas *et al.* (2003) e Werkentin *et al.* (2011) in ambienti principalmente fluviale, a riprova della forte adattabilità di questo gruppo.

Alpha-Proteobacteria

Il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria*, sottoclasse tipica di ambienti marini (Gonzalez *et al.*, 1997; Rappe *et al.*, 2000, Bernhard *et al.*, 2005), spesso viene rinvenuta anche in ambienti di estuario con gradienti di salinità crescente, come osservato da Kirchman *et al.*, (2005). Recenti studi hanno però osservato una forte presenza di questo gruppo in ambienti di acqua dolce (Nishimura *et al.*, 2007). Molti studi hanno concentrato l'attenzione su questo gruppo, indicando dei valori medi di abbondanza assai variabili. Cottrell e Kirchman (2000) studiando gli ambienti costieri della California hanno riscontrato valori di abbondanza compresi tra il 10 e il 40% delle cellule totali batteriche;

altri studi tra i quali quelli di Sekar *et al.*, (2004) e Shattenhofer *et al.*, (2009), in ambienti marini hanno evidenziato dei valori massimi inferiori rispetto ai lavori precedenti, con delle percentuali di ritrovamento comprese tra il 20% e il 26% delle cellule batteriche totali. Nishimura e colleghi (2007) hanno osservato come le abbondanze del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* nel lago mesotrofico Biwa (Giappone), dominano la comunità con abbondanze che possono raggiungere anche il 54% dell'abbondanza procariotica totale. Questo valore risulta essere fortemente in contrasto con le nozioni generali che sostengono una bassa abbondanza di questo gruppo in ambienti di acqua dolce (Glöckner *et al.*, 1999; Kirchman *et al.*, 2005). Questi dati dimostrano quindi come l'abbondanza sia estremamente variabile in relazione alle caratteristiche ambientali.

I risultati ottenuti mostrano come nell'alto Adriatico il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* sia prettamente dominante rispetto agli altri gruppi, con percentuali molto vicine ai valori del 40%. Questo valore trova conferma nei valori riscontrati dagli studi di Cottrell e Kirchman (2000). L'abbondanza del gruppo sembra essere favorita dalle condizioni di una buona concentrazione di nutrienti in ambienti con acque oligo-mesotrofiche quali sono quelle dell'alto Adriatico (Riemann *et al.*, 2000; Pinhassi & Berman, 2003; Fuchs *et al.*, 2004; Percent *et al.*, 2008). A tal fine le abbondanze di questo gruppo sono state messe in relazione con la concentrazione dei nitrati; la correlazione ha mostrato un incremento dell'abbondanza in relazione all'aumento della concentrazione di nutrienti ($r = 0.86$; $r = 0.85$, $p < 0.05$) a conferma dei lavori di Nishimura e colleghi (2007).

Ulteriori analisi hanno permesso di osservare una stretta relazione tra le abbondanze batteriche per questo gruppo e le concentrazioni di sostanza organica (POC). In particolare le correlazioni ($r = 0.92$; $r = 0.85$, $p < 0.05$; Fig. 3.1.5.3) hanno permesso di osservare un aumento dell'abbondanza batterica in relazione all'aumento della concentrazione di sostanza organica particolata. Tale valore trova conferma negli studi di De Figueiredo *et al.*, (2007) che hanno evidenziato una marcata abbondanza in ambienti molto ricchi di sostanza organica e nutrienti.

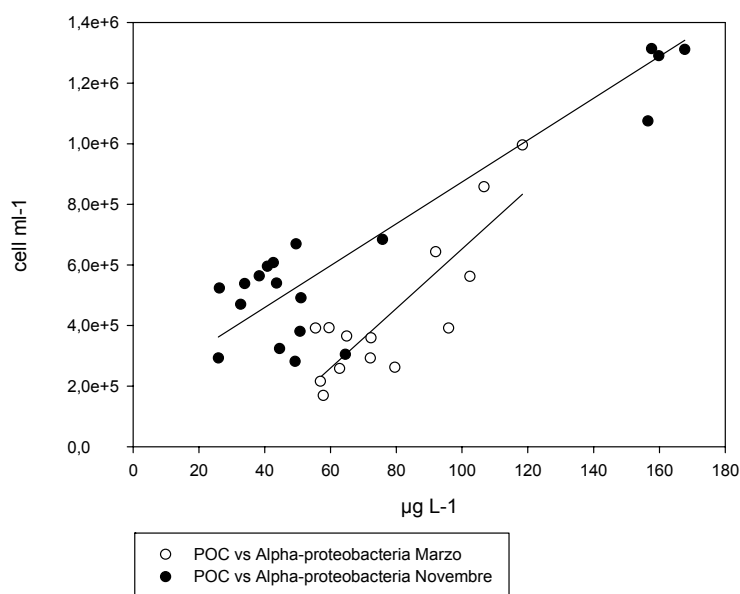


Fig. 3.1.5.3. Correlazione tra POC ($\mu\text{g l}^{-1}$) e l'abbondanza del gruppo (cell ml^{-1}) degli *Alpha-Proteobacteria*.

Gamma-Proteobacteria

Studi recenti di Ettoumi *et al.*, (2010) e Simonato *et al.*, (2010) sul gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* hanno mostrato un'abbondanza maggiore ed una maggiore attività in ambienti marini rispetto a quelli di acqua dolce, soprattutto a latitudini più alte. I valori di abbondanza relativa ottenuti nei campionamenti in mare Adriatico sono compresi tra un valore minimo del 2% e un massimo del 17%; tali valori, risultano fortemente inferiori a quelli riportati da Pinhassi *et al.*, (2000) e Teira *et al.*, (2008) (valori medi del 20%).

Nei campioni esaminati in mare Adriatico sono state osservate delle abbondanze relative più alte nelle stazioni più prossime alla costa rispetto a quelle del largo. In relazione a queste osservazioni sono state quindi svolte delle analisi di correlazione, che hanno evidenziato una relazione negativa tra l'abbondanza batterica di questo gruppo e la salinità con una diminuzione dell'abbondanza all'aumentare della salinità ($r = -0.80$, $p < 0.05$; $r = -0.87$, $p < 0.05$). Questa diminuzione dell'abbondanza in relazione ad una maggiore salinità delle acque del mare Adriatico, risulta in disaccordo con il lavoro di Sunamura *et al.*, (2005) che, al contrario evidenzia un aumento dell'abbondanza in ambienti estuarini-costieri o comunque con una salinità crescente. I valori di abbondanza

per questo gruppo, come già descritto precedentemente, risultano, soprattutto nel mese di Novembre, in forte decremento soprattutto alle acque più profonde e nelle stazioni più al largo. Questa caratteristica trova conferma in studi recenti (Schattenhofer *et al.*, 2009), in cui sono evidenziati valori di abbondanza molto bassi, circa il 2% in acque particolarmente profonde.

In ultimo il gruppo filogenetico dei *Gamma-Proteobacteria* è stato correlato con la concentrazione di alcuni nutrienti mostrando un'influenza esercitata su questo gruppo dalla concentrazione dei composti dell'azoto; in particolare si è riscontrato che all'aumentare della concentrazione dei nitrati ($r = 0.90$, $p < 0.05$; $r = 0.85$, $p < 0.05$) si registra un aumento dell'abbondanza del gruppo filogenetico. I nostri dati trovano conferme nei lavori di Bernhard e colleghi (2005) in cui si evidenzia come il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* sia fortemente adattato a condizioni di alte concentrazioni di nutrienti.

3.1.6 Attività cellulare (FISH-BrdU)

L'attività batterica è stata analizzata tramite la tecnica della BrdU-CARD, mediante l'incorporazione della bromodeossiuridina in cellule attive sintetizzanti DNA (Borneman, 1999). Questa tecnica recentemente è stata ottimizzata per comprendere l'attività delle comunità batteriche in ambienti marini (Pernthaler & Pernthaler, 2005).

In figura 3.1.6.1 sono riportate le percentuali delle cellule batteriche per la campagna di Marzo ($7.4 \pm 2.9\%$) e quella di Novembre ($9.4 \pm 6.7\%$) rispettivamente.

Tali valori sono confrontabili con quelli riportati nei lavori di Pernthaler *et al.*, (2002) per le comunità del mare del Nord, con valori medi compresi tra il 10% e il 38%. I valori osservati risultano molto inferiori, rispetto a quelli riportati nei lavori di Hamasaki *et al.*, (2004), in cui si raggiungono dei valori di attività pari al 47% delle cellule batteriche totali.

Nella campagna del mese di Marzo si può osservare una maggiore attività cellulare nelle stazioni superficiali rispetto a quelle di profondità, con valori che risultano pari al $10.2 \pm 0.9\%$ per la superficie e $7.2 \pm 0.5\%$ nei campioni di profondità. Questa differenza è possibile osservarla anche nelle altre due stazioni dove i valori massimi sono compresi tra $10.8 \pm 0.4\%$ e $8.3 \pm 3.5\%$ nei campioni superficiali rispettivamente per la stazione S2 e S4, e i valori minimi con un intervallo compreso tra il $4.4 \pm 0.3\%$ e il $3.4 \pm 0.4\%$ per le stazioni S2 e S4.

Il mese di Novembre rispetto alla campagna di Marzo presenta delle notevoli variazioni. L'attività cellulare risulta essere molto più elevata nella stazione più prossima alla costa con valori pari al $24.4 \pm 7.0\%$ e al $12.1 \pm 0.7\%$ rispettivamente in superficie ed in profondità. Nella seconda e nella terza stazione di campionamento si osserva una distribuzione differente rispetto a quella che si osserva nella campagna di Marzo; per queste due stazioni le frazioni più abbondanti delle cellule attive si trovano nelle acque più profonde e non in quelle superficiali. Nella stazione più al largo, S4, la frazione di cellule attive rimane costante tra le quote di campionamento, con una percentuale circa del 4%.

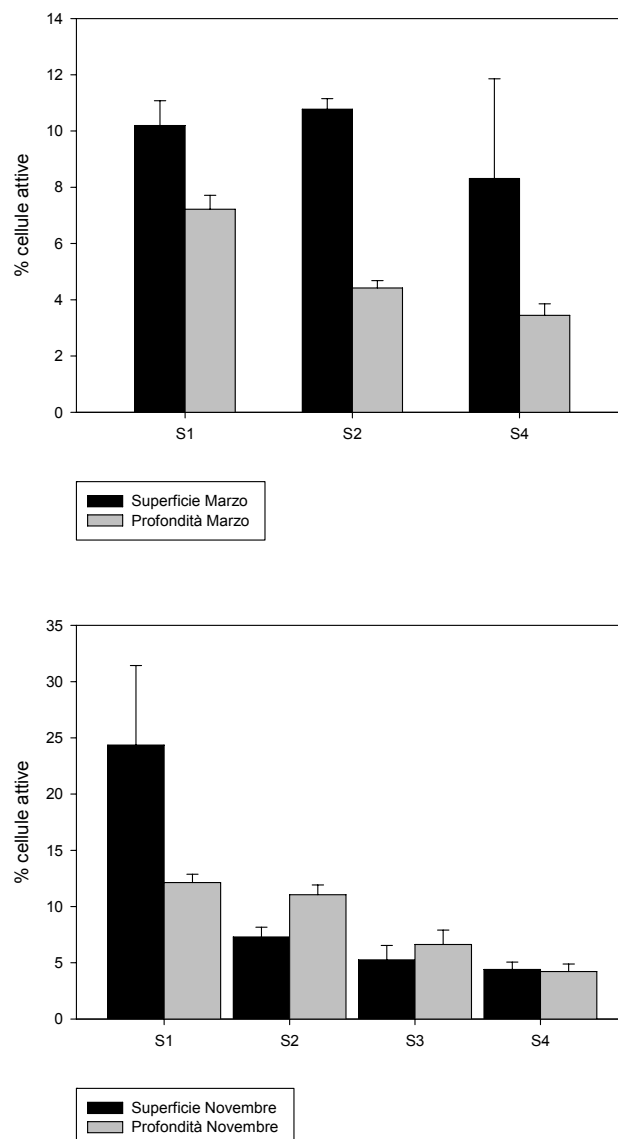


Fig. 3.1.6.1. Percentuale di cellule attive in superficie e profondità nei siti di campionamento (S1, S2, S3, S4) in Marzo e Novembre.

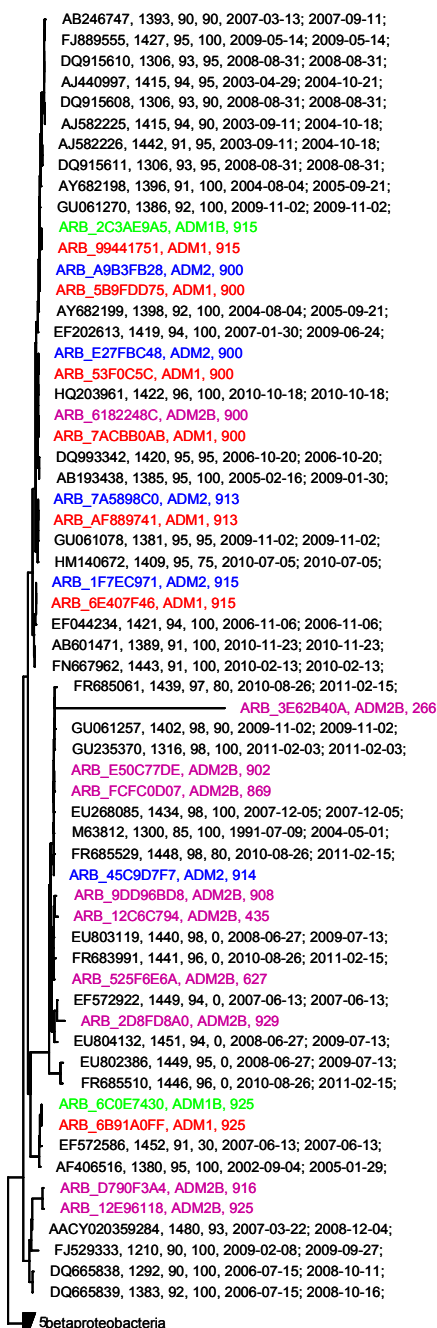
L'analisi delle correlazioni ha mostrato una relazione tra il valore percentuale delle cellule attive, e la concentrazione dei nitrati; in entrambe le due campagne, si ha incremento dell'attività cellulare all'aumentare delle concentrazioni NO_3 ($r = 0.81$; $r = 0.78$, $p < 0.05$). Questi risultati inoltre confermano una maggiore percentuale di cellule attive nei campioni di superficie rispetto a quelli di profondità, dove la concentrazione dei nutrienti risulta maggiore.

3.1.7 Analisi della diversità batterica per il 16S rDNA

Per meglio descrivere dal punto di vista qualitativo la comunità batterica sono state costruite due diverse *clone library* per le stazioni costiere (superficie) e per le stazioni al largo (profondità) per le campagne del mese di Marzo e di Novembre. Le quattro librerie geniche ottenute comprendono 230 sequenze parziali dominate dai quattro gruppi batterici, *Bacteroidetes*, *Alpha-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria* e *Actinobacteria*. Pochi cloni erano affiliati ad altri gruppi quali i *Beta-Proteobacteria*, i *Cyanobacteria* e *Verrucomicrobia*.

Molte delle sequenze ritrovate nelle *clone library* costruite appartengono al gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* (30% delle sequenze totali). In Fig. 3.1.7.1 sono mostrate le relazioni filogenetiche e le sequenze parziali isolate per questo gruppo. Le sequenze di questo gruppo filogenetico sono distribuite sia nelle due librerie di superficie che di profondità, ad indicare una distribuzione molto ampia come già osservato da Acinas e colleghi (1999). Molte delle sequenze (46%) sono affiliate con l'ordine delle *Rhodobacterales* mentre il 40% al genere SAR11, organismo tipicamente di ambiente marino. La predominanza di questo particolare genere è stata osservata in differenti siti suggerendo l'importante ruolo svolto da questo gruppo in ambienti marini (Morris *et al.*, 2002; Selje *et al.*, 2004). Le sequenze affiliate a SAR11 risultano inoltre essere presenti soprattutto nelle librerie delle stazioni di profondità, caratterizzate da oligo-mesotrofia, quindi parzialmente in accordo con gli studi di Morris e colleghi (2002) e Simonato *et al.*, (2010) in cui si osserva una maggiore abbondanza in acque prettamente oligotrofiche. Il 13% delle sequenze affiliate rispettivamente al genere *Takeymaria* e *Loktanella* sono relazionate all'ordine delle *Rhodobacterales*. Alcune sequenze sono inoltre relazionate con l'ordine delle *Rhodospirillales* (13%). Il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* domina la comunità nella colonna, rappresentando circa il 19% di tutte le sequenze. Molte delle sequenze ottenute dai campioni sono affiliate all'ordine *Alteromonadales* (47%) con sequenze affiliate al genere SAR92 (19%). Le sequenze affiliate all'ordine delle *Pseudomonales* (13%) sono tutte relazionate al genere *Psychrobacter*. Molte delle sequenze ottenute dai campioni risultano essere affiliate al genere SAR86 relazionato con il clade *Oceanospirillales* (22%). Le sequenze parziali ottenute per questo gruppo sono rappresentate dalla Fig. 3.1.7.2. La *clone library* relativa a questo gruppo mostra come le diverse sequenze siano presenti soprattutto in superficie nelle stazioni più prossime alla costa. I nostri dati trovano parzialmente conferma nei

lavori di Lebaron e colleghi (2001), in cui si evidenzia la presenza di questo gruppo sia in ambienti di acque dolci che marine, con maggiore tendenza ad una maggiore abbondanza in ambienti marini. Nelle diverse librerie costruite, gli *Actinobacteria* rappresentano il terzo gruppo più abbondante (15% delle sequenze totali) con un'abbondanza maggiore nei siti a più bassa salinità. Molte delle sequenze ritrovate nelle stazioni costiere, risultano essere affiliate con il cluster delle *Micrococcales*, *Microbacteriaceae* (88% delle sequenze totali del gruppo *Actinobacteria* affiliate con il genere *Candidatus Aquiluna*) e con il gruppo delle non-coltivate della famiglia *Acidimicrobiaceae*. Anche per questo gruppo è stato costruito un albero filogenetico (Fig. 3.1.7.3). Le sequenze di questo gruppo, tipicamente di acqua dolce, (Warnenke *et al.*, 2005) sono state ritrovate principalmente nelle stazioni costiere, a testimonianza della forte influenza delle acque dolci in ambiente costiero. Tale ritrovamento concorda con i precedenti studi che hanno analizzato la composizione batterica in ambienti sottoposti a gradiente di salinità (Crump *et al.*, 1999, 2004; Trousselier *et al.*, 2002; Selje *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2006). Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria*, rappresenta il 13% delle sequenze appartenenti al gruppo più ampio dei *Bacteroidetes*. La maggioranza delle sequenze ritrovate sono affiliate alla classe *Flavobacteriales*, genere NS5 gruppo marino (50%) e NS4 gruppo marino. Alcune sequenze sono relazionate con il genere *Cryomorphocea* (20%), *Fluvicola* (6%) e *Crocinitomix* (13%). In Fig. 3.1.7.4. sono riportate le sequenze e la loro posizione all'interno dell'albero filogenetico. Come è possibile osservare dall'albero filogenetico, le sequenze del gruppo *CF* sono maggiormente abbondanti nella stazione superficiale sia per il campionamento di Marzo che per quello di Novembre. Questi risultati mostrano una stretta relazione tra l'abbondanza di questo gruppo e le alte concentrazioni di clorofilla (misurate nei siti di campionamento più superficiali e prossimi alla costa) in accordo con i lavori di Pinhassi *et al.*, (2000). I nostri risultati sono in accordo con i lavori di Riemann *et al.*, (2000), Pinhassi *et al.*, (2004), e Riemann *et al.*, (2008), in cui si osserva la presenza di questo gruppo in ambienti costieri soprattutto in relazione ai processi di degradazione della sostanza organica. Inoltre, alcune delle sequenze ritrovate sono associate al genere *Fluvicola*, caratteristica di acque dolci; tale risultato mostra quindi come sotto costa sia forte la presenza e il mescolamento acque provenienti da diversi ambienti.



0.10

Fig. 3.1.7.1. Albero filogenetico per il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* basato sull'algoritmo Neighbour Joining (NJ) ottenuto dall'analisi delle sequenze geniche per il 16S rDNA calcolato con un filtro al 50%. Tutte le sequenze mostrate presentano una lunghezza superiore ai 1200 nucleotidi.

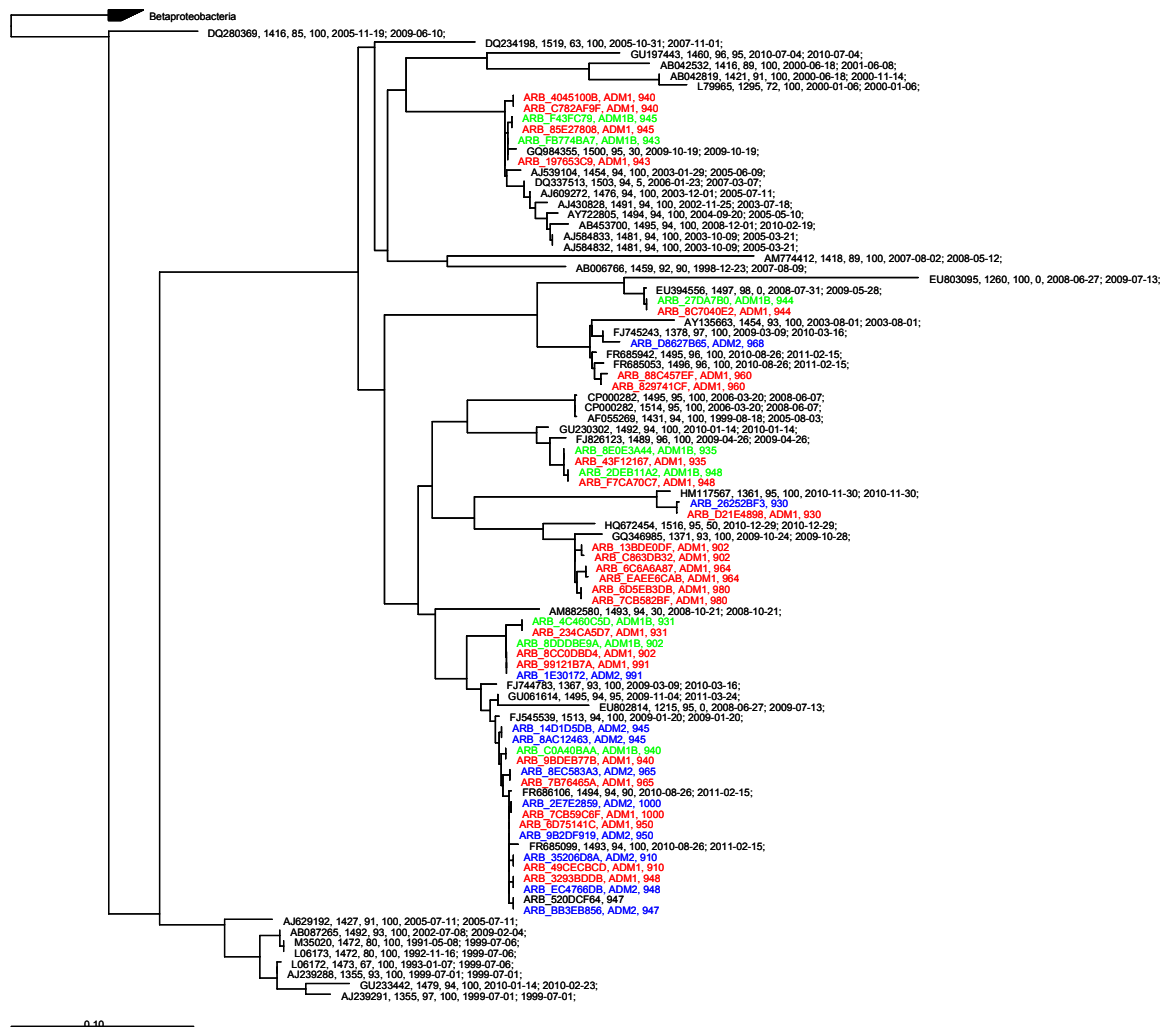


Fig. 3.1.7.2. Albero filogenetico per il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* basato sull'algoritmo Neighbour Joining (NJ) ottenuto dall'analisi delle sequenze geniche per il 16S rDNA calcolato con un filtro al 50%. Tutte le sequenze mostrate presentano una lunghezza superiore ai 1200 nucleotidi.

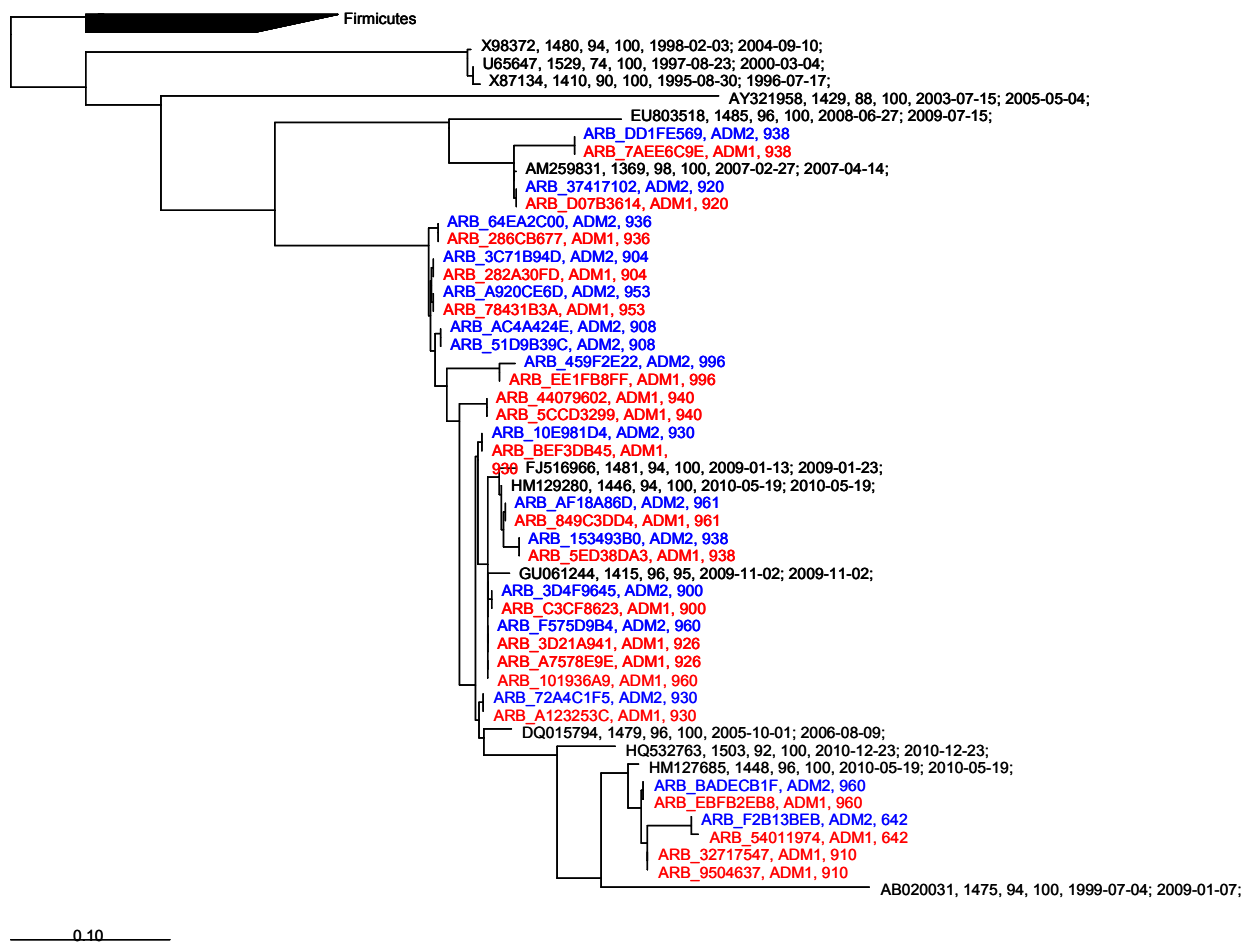


Fig. 3.1.7.3. Albero filogenetico per il gruppo degli *Actinobacteria* basato sull'algoritmo Neighbour Joining (NJ) ottenuto dall'analisi delle sequenze geniche per il 16S rDNA calcolato con un filtro al 50%. Tutte le sequenze mostrate presentano una lunghezza superiore ai 1200 nucleotidi.

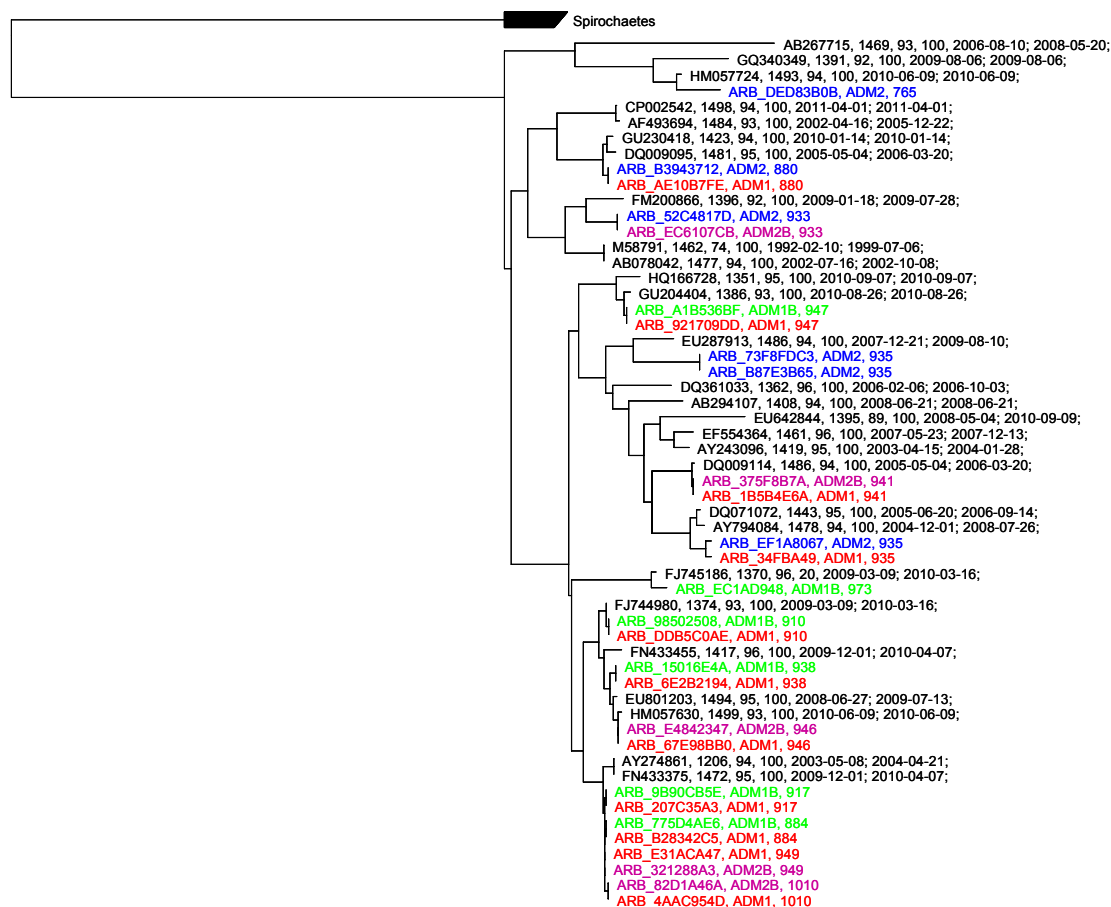


Fig. 3.1.7.4. Albero filogenetico per il gruppo degli *Bacteroidetes* basato sull'algoritmo Neighbour Joining (NJ) ottenuto dall'analisi delle sequenze geniche per il 16S rDNA calcolato con un filtro al 50%. Tutte le sequenze mostrate presentano una lunghezza superiore ai 1200 nucleotidi.

3.1.8 Conclusioni del capitolo

I risultati ottenuti mostrano come nel mese di Marzo la colonna d'acqua sia completamente instabile, caratteristica tipicamente invernale mentre nel mese di Novembre, la colonna d'acqua presenta una stratificazione termica, riconducibile ad una condizione di fine estate. Ulteriori differenze tra le due campagne sono state osservate anche per quanto riguarda le condizioni trofiche delle acque, con una situazione di oligotrofia nel mese di Marzo e di mesotrofia in Novembre, con acque più ricche nelle stazioni costiere e nei siti più superficiali delle stazioni intermedie. In questo contesto la comunità batterica ha mostrato delle forti relazioni con le caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua sia in termini di abbondanza che di composizione della comunità. La comunità batterica nelle stazioni costiere raggiunge densità più alte rispetto alle stazioni più al largo; al contrario, non si osservano cambiamenti significativi con il variare della profondità. Nel mese di Marzo, con acque caratterizzate da oligotrofia, la bassa concentrazione di fosforo e l'alto valore del rapporto N/P sembrano limitare la crescita batterica. Nel mese di Novembre il più elevato stato trofico delle acque si riflette in una maggiore abbondanza batterica ed i nutrienti sembrano giocare un ruolo minore nel limitare la crescita batterica, si osserva infatti un basso valore del rapporto N/P più vicino al rapporto ottimale per la biomassa batterica. Anche l'attività della comunità, misurata come tasso di duplicazione cellulare tramite l'incorporazione di BrdU, mostra valori più elevati nelle stazioni costiere (in particolare nel mese di Novembre).

Per quanto riguarda la dinamica dei gruppi filogenetici analizzati, seppur si osservi sempre una forte dominanza degli *Alpha-Proteobacteria* (con percentuali che raggiungono il 51% di tutte le cellule batteriche visualizzate), la composizione della comunità microbica mostra una forte stagionalità. Nel mese di Marzo si osserva una distribuzione più omogenea dei vari gruppi rispetto a Novembre in cui si evidenzia un aumento dei *Cytophaga-Flavobacteria* contrapposto ad un netto decremento dell'abbondanza relativa del gruppo dei *Gamma-Proteobacteria*. L'abbondanza del gruppo degli *Alpha-Proteobacteria*, con una forte presenza di sequenze relative al ceppo SAR11 prettamente marino, conferma l'adattabilità di questo gruppo a forti variazioni nelle concentrazioni dei nutrienti, soprattutto nitrati, lungo il gradiente trofico (Riemann *et al.*, 2000; Pinhassi e Berman, 2003; Bernhard *et al.*, 2005; Percent *et al.*, 2008). Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* risulta essere fortemente influenzato dalla presenza di un gradiente di salinità e dall'alta concentrazione di materia organica particolata di

derivazione alloctona. In particolare, la presenza di questo gruppo risulta più elevata sotto costa dove vi è un grande apporto di materiale organico di derivazione fluviale. Questo dato trova conferma inoltre nella presenza di sequenze associate al genere *Fluvicola*, prettamente di acque dolci, a dimostrazione della forte influenza degli apporti di acqua dolce sulla linea di costa. Anche gli *Actinobacteria*, gruppo tipicamente di acque dolci, sono stati ritrovati solo nelle stazioni più prossime alla costa. La contestuale presenza di microrganismi prettamente marini e di acqua dolce sottocosta conferma quindi il carattere ecotonale di queste zone in cui la composizione della comunità microbica risulta fortemente determinata dal rimescolamento di masse d'acqua di diversa origine. Le comunità microbiche sono quindi fortemente influenzate in termini di abbondanza, di attività e di composizione filogenetica dalle caratteristiche chimico-fisiche della colonna d'acqua, che a loro volta risentono fortemente della stagionalità.

3.2 Caratterizzazione del biofilm in un ambiente fluviale soggetto ad un gradiente di inquinamento antropico

Nell'ambito di un progetto di collaborazione sullo studio dei biofilm, una parte del lavoro di Dottorato, ha avuto come scopo la valutazione delle caratteristiche strutturali delle comunità microbiche associate ai biofilm bentonici in relazione alla qualità delle acque.

L'effetto di un crescente livello di inquinamento sulla comunità batterica potrebbe infatti condurre a due diverse risposte: a breve termine, con alterazioni di tipo fisiologico e a lungo termine, con cambiamenti nella struttura di comunità. Dal punto di vista fisiologico si avrebbero delle alterazioni nella funzionalità batterica (produzione, respirazione ed attività enzimatiche extracellulari), mentre nelle alterazioni a lungo termine le conseguenze potrebbero essere legate alla dinamica di specifici ceppi batterici (Bonnineau *et al.*, 2010; Tlili *et al.*, 2010)

3.2.1 Sito di studio e campionamento

Il fiume Llobregat è uno dei più importanti fiumi della Spagna. Nasce a Castellar de n'Hug, nel Berguedà (Catalogna), e sfocia dopo un percorso di circa 157.6 km (Tomàs and Sabater, 1985) nel Mar Mediterraneo, presso El Prat de Llobregat non lontano da Barcellona. Il fiume Llobregat è il più grande della Catalogna e si estende dai monti Pirenei al Mar Mediterraneo con un bacino di circa 4.948 km². Dal punto di vista idrologico il Llobregat è un fiume tipicamente mediterraneo, con un flusso caratterizzato da una elevata variabilità e strettamente controllato da precipitazioni stagionali. Il fiume riceve scarichi di acque reflue industriali ed urbane (137 milioni m³/anno, di cui il 92% proviene da impianti di trattamento delle acque reflue) che non possono essere diluite con il solo flusso naturale del fiume, pari a 0.68-6.5 m³/s. Inoltre, la parte centrale del bacino riceve fanghi con alto contenuto di sale di origine naturale, che hanno causato un aumento di salinità delle acque a valle, come riportato dai studi di Esteban & Prat (2006). Nel corso dell'esperimento, per meglio comprendere ed analizzare l'impatto di un diverso livello di inquinanti sulla struttura delle comunità microbiche associate ai biofilm, sono stati identificati tre siti di studio. Il primo sito è situato nella zona più a monte non è sottoposto a scarichi industriali ed scarichi urbani. (Castellbell, CB). Il secondo ed il terzo sito di campionamento (MT, Mina de Terrassa ed SJD, Sant Joan

Despí), come possiamo osservare dalla Fig. 3.2.1.1 sono situati più a valle in un tratto del fiume maggiormente influenzato da impatto antropico.

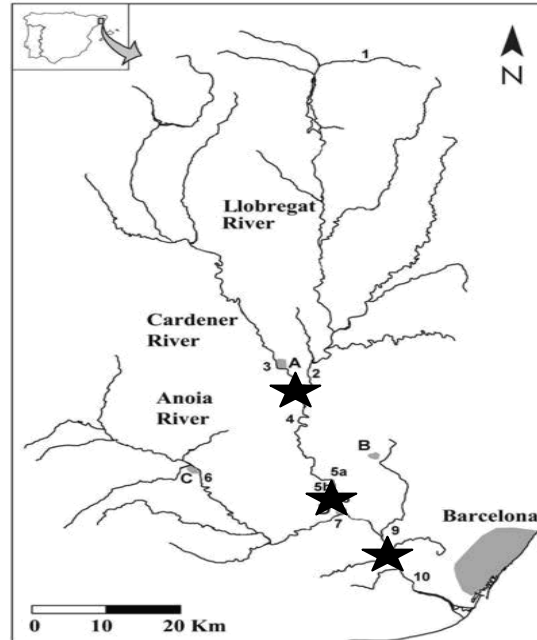


Fig. 3.2.1.1. Bacino imbrifero del fiume Llobregat (Barcellona, Spagna). Le tre stelle indicano i siti di campionamento (Proia *et al.*, unpublished).

Mesocosmi sperimentali (diametro di 19 cm, altezza di 9 cm) sono stati allestiti con acqua prelevata dai tre siti di campionamento. L'acqua veniva cambiata tre volte a settimana, per tutto l'arco dell'esperimento. Per poter generare un flusso di corrente è stata utilizzata una pompa. I biofilm sono stati coltivati sotto condizioni di temperatura e luce controllate (18°C; 12h luce; 12h buio), utilizzando come substrati artificiali piastrelle di vetro smaltato di 1 cm². Tutti i mesocosmi sono stati collocati in un incubatore (SCLAB) con un sistema di controllo della temperatura e della luce. Nel corso dell'esperimento i substrati sono stati campionati rispettivamente dopo 25 e 34 giorni di immersione e, analizzati con la tecnica CARD-FISH, *Catalyzed Reported Deposition*, per l'analisi delle strutture delle comunità microbiche. La seconda parte dell'esperimento ha previsto, dopo una fase iniziale di accrescimento del biofilm (25 giorni), delle traslocazioni dei campioni in mesocosmi con acque provenienti dai siti maggiormente impattati secondo il seguente schema: dal sito MT al sito SJD (MT→SJD), da CB a MT (CB→MT,) e da CB a SJD (CB→SJD), per poter valutare

l'impatto di tale inquinamento sulla struttura delle comunità batteriche nel biofilm (Fig. 3.2.1.2).

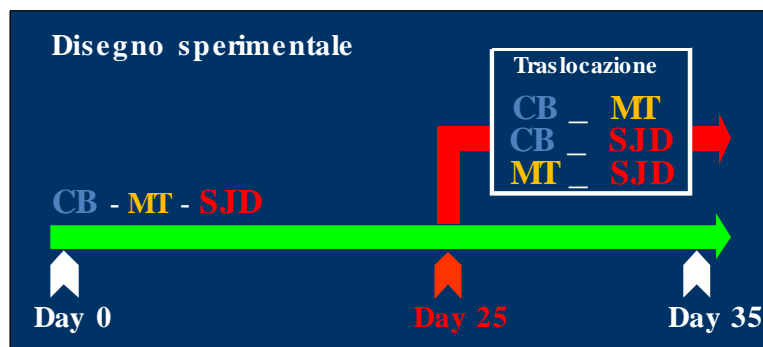


Fig 3.2.1.2. Disegno sperimentale caratterizzato da una prima fase di accrescimento e le successive traslocazioni dei substrati

Successivamente al prelievo il biofilm è stato staccato dai supporti e filtrato su filtri di policarbonato 0.2- μm (porosità 0.2 μm , diametro 47 mm, Nuclepore Corporation, USA). La composizione della comunità batterica è stata analizzata per mezzo della tecnica bio-molecolare *Catalyzed Reported Deposition* (CARD-FISH), per l'identificazione e la quantificazione dei cinque gruppi batterici quali: *Alpha*-, *Beta-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* (*Bacteroidetes*) ed *Actinobacteria*.

3.2.2 Caratterizzazione chimico-fisica del fiume Llobregat

I parametri chimico-fisici sono stati misurati nel fiume Llobregat nel periodo autunnale (Ottobre - Novembre 2009). I valori medi sono riportati in figura 3.2.2.1. La conducibilità presenta valori più bassi ($1633 \pm 174 \mu\text{S cm}^{-1}$) nel primo sito a monte (CB); nella zona intermedia i valori di conducibilità aumentano fino a raggiungere il massimo in SJD ($2500 \pm 365 \mu\text{S cm}^{-1}$).

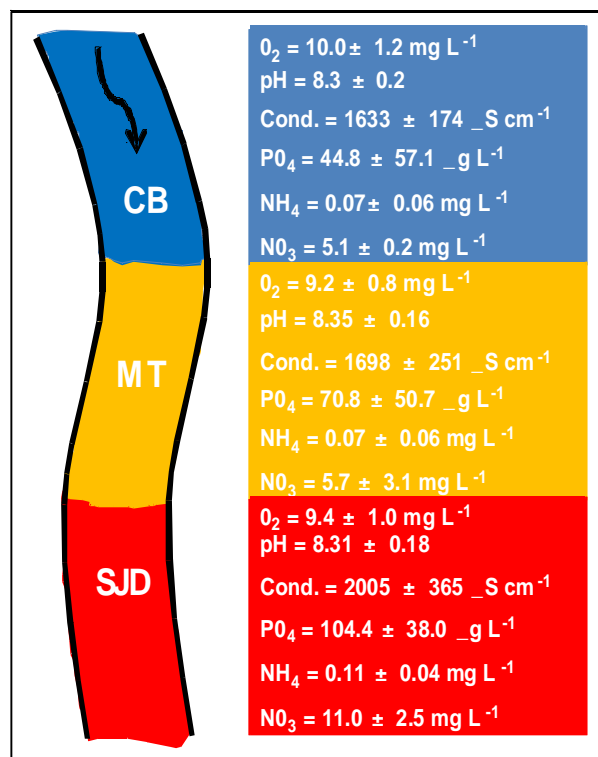


Fig. 3.2.2.1. Parametri chimico-fisici del fiume Llobregat (Proia *et al.*, unpublished).

Il pH e l'ossigeno non mostrano variazioni rappresentative nei tre siti, con valori medi di 8.32 ± 0.18 unità e 9.53 ± 1 mg L⁻¹. Le concentrazioni di ammonio (NH_4) tendono ad aumentare lungo il corso fluviale, variando tra 0.07 ± 0.06 mg L⁻¹ a monte e 0.11 ± 0.04 mg L⁻¹ a valle del fiume. La concentrazione dei nitrati (NO_3) e dei fosfati (PO_4) è simile nei tre siti campionati; i nitrati raggiungono valori compresi tra 5.1 ± 0.2 mg L⁻¹ a CB e 11.0 ± 2.5 mg L⁻¹ nel sito SJD; per i fosfati (PO_4) si registrano valori crescenti passando dal sito CB (44.8 ± 57.1 μg L⁻¹) a SJD (104.4 ± 38.0 μg L⁻¹). Questi valori sono in linea con quanto riportato in altri studi effettuati nel fiume Llobregat (Leucena *et al.*, 1988) in cui non si evidenziano grandi fluttuazioni dei parametri fisici lungo il corso del fiume, fatta eccezione per la conducibilità che tende sempre ad aumentare. Una maggiore variabilità, invece, possiamo osservarla per quanto riguarda i parametri chimici, che sono strettamente correlati ai diversi livelli di inquinamento fluviale. Le concentrazioni di nutrienti aumentano lungo il gradiente di inquinamento monte-valle. Le basse concentrazioni di ossigeno disciolto e le elevate concentrazioni di nutrienti nella zona a valle del fiume sono in accordo con gli studi effettuati da Munoz *et al.*, (2009).

3.2.3 Abbondanza batterica nel fiume Llobregat

L'abbondanza batterica totale durante l'accrescimento del biofilm (25 e 34 giorni) è rappresentata nella Fig. 3.2.3.1. Le cellule batteriche totali tendono ad aumentare lungo il gradiente di inquinamento monte-valle. Dopo 25 giorni di accrescimento si registra il valore massimo nel sito maggiormente impattato (SJD) con abbondanza di $(5.8 \cdot 10^7 \pm 2.0 \cdot 10^7 \text{ cell ml}^{-1})$ ed un valore minimo nel sito CB $(3.1 \cdot 10^7 \pm 5.5 \cdot 10^6 \text{ cell ml}^{-1})$, soggetto ad un minore inquinamento. Dopo 34 giorni di accrescimento, le abbondanze sono molto simili in tutti i siti con valori medi che oscillano tra $1.1 \cdot 10^8 \pm 2.0 \cdot 10^7$ e $1.3 \cdot 10^8 \pm 2.3 \cdot 10^7 \text{ cell ml}^{-1}$. A conferma è stata effettuata l'analisi statistica ANOVA-*One Way*) che ha evidenziato delle differenze significative tra i tre gruppi (siti) analizzati ($H = 19.08$, $p < 0.001$). Sono stati effettuati dei confronti tra i singoli siti, attraverso la *Parwise Multiple Comparison* (Test t); queste analisi hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa tra i siti CB - SJB ($t = 7.4$; $p < 0.05$) ed i siti MT - SJB ($t = 5.7$; $p < 0.05$). Non si osservano, invece, differenze significative tra il sito CB ed MT ($t = 1.69$; $p < 0.05$). In ultimo, è stata effettuata l'analisi della varianza a due vie (*Two Way* ANOVA), considerando l'abbondanza batterica nei tre siti e nei due tempi di campionamento. Questa analisi ha mostrato una differenza significativa tra i diversi livelli del fattore "Sito" ($F = 30.14$, $p < 0.001$) e del fattore "tempo" ($F = 775.39$, $p < 0.001$) seppur non esiste una significativa interazione tra i due fattori (Sito x Tempo: $F = 0.77$, $p = 0.463$). I risultati hanno mostrato quindi delle abbondanze batteriche significativamente differenti tra i diversi siti evidenziando quindi un aumento dell'abbondanza batterica totale nel biofilm, sia nel tempo sia lungo il gradiente monte-valle del fiume. Tali cambiamenti inoltre, potrebbero essere dovuti al gradiente di inquinamento nelle diverse zone di campionamento, con un maggiore impatto antropico nel sito intermedio MT e, soprattutto, nel tratto a valle del fiume Llobregat (SJB). In sintesi, i risultati ottenuti permettono, in accordo con quanto osservato da Battin *et al.* (2003), di dimostrare che l'abbondanza batterica nel biofilm, tende a variare nel tempo in relazione ai diversi fattori biotici e abiotici che caratterizzano il corso d'acqua. Inoltre, i dati sono in linea con quanto osservato da Fazi e colleghi (2005), su analisi della comunità microbica associata al biofilm in tre diversi fiumi che differivano fra loro per il contenuto di nutrienti in acqua. I dati mostrano in sintesi una più lenta crescita, stimata in abbondanza cellulare, nei primi 25 giorni di sviluppo del biofilm, in accordo con i lavori di Battin *et al.*, (2007).

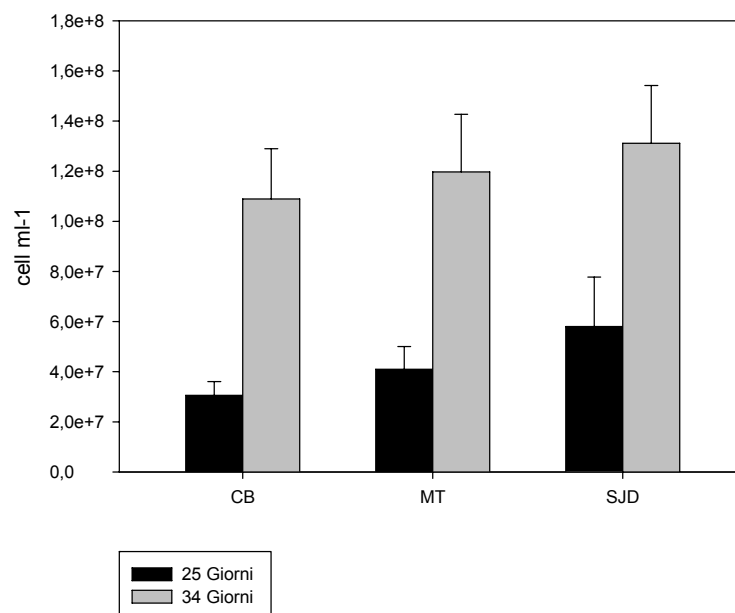


Fig. 3.2.3.1. Variazione dell'abbondanza batterica nei tre siti di campionamento dopo 25 e 34 giorni di accrescimento.

3.2.4 Struttura della comunità batterica

La composizione della comunità batterica è stata analizzata per mezzo della CARD-FISH, utilizzando sonde oligonucleotidiche specifiche per i seguenti gruppi: *Alpha-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria*, *Gamma-Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* (*Bacteroidetes*) e *Actinobacteria*. Per valutare le risposte strutturali delle comunità batteriche i biofilm sono stati traslocati in acque maggiormente impattate, seguendo lo schema riportato in Fig. 3.2.1.2. La Fig. 3.2.4.1 mostra le abbondanze batteriche dei gruppi specifici, espresse in cellule per millilitro nei tre diversi siti rispettivamente al giorno 25 e al giorno 34 di accrescimento. Si osserva al giorno 25 nel sito CB, come l'abbondanza dei *Beta-* ($6.1 \cdot 10^6 \pm 2.4 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹) sia minore rispetto agli altri due siti campionati MT ed SJD; i gruppi degli *Alpha-* e dei *Gamma-Proteobacteria* tendono invece a prevalere nella comunità microbica del primo sito CB ($1.0 \cdot 10^7 \pm 3.0 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ *Alpha-*; $1.1 \cdot 10^7 \pm 1.4 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ per i *Gamma-*). Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* presenta dei valori di abbondanza relativamente più alto nel sito CB rispetto ai siti MT ed SJD ($3.1 \cdot 10^6 \pm 3.5 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹), mentre il gruppo filogenetico degli *Actinobacteria* risulta essere scarsamente rappresentato ($5.3 \cdot 10^5 \pm 2.0 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹). Nel secondo sito di campionamento, MT, si ha una predominanza dei tre gruppi dei

Proteobacteria con valori pari a $1.2 \cdot 10^7 \pm 8.0 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹ per gli *Alpha*-, $1.9 \cdot 10^7 \pm 2.3 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ per i *Beta*-, ed $1.2 \cdot 10^7 \pm 2.2 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ per il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria*. I gruppi dei *Cytophaga-Flavobacteria* e degli *Actinobacteria* presentano valori molto bassi all'interno della comunità nel sito MT ($1.4 \cdot 10^6 \pm 6.3 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹ e $5.3 \cdot 10^5 \pm 4.3 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹ rispettivamente). Il terzo sito di campionamento, SJD, situato a valle del fiume, ha valori di abbondanza relativamente simili al sito precedente (MT); in particolare per gli *Alpha*- si registra un lieve aumento dell'abbondanza batterica con valori pari a $2.3 \cdot 10^7 \pm 5.7 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹, mentre i *Beta*- ed i *Gamma-Proteobacteria* presentano valori pari a $2.2 \cdot 10^7 \pm 2.6 \cdot 10^6$ e $1.3 \cdot 10^7 \pm 3.7 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹. I *Cytophaga-Flavobacteria* e gli *Actinobacteria* continuano a rappresentare la minore componente della comunità batterica ($1.4 \cdot 10^6 \pm 4.4 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹, $2.9 \cdot 10^5 \pm 2.6 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹). L'elevata abbondanza dei *Beta*-, nei siti MT ed SJD nei primi giorni di colonizzazione del biofilm, è in accordo con studi condotti da Manz *et al.* (1999), nei quali si evidenzia come il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* tenda a prevalere nella popolazione batterica durante lo sviluppo iniziale dell'aggregato.

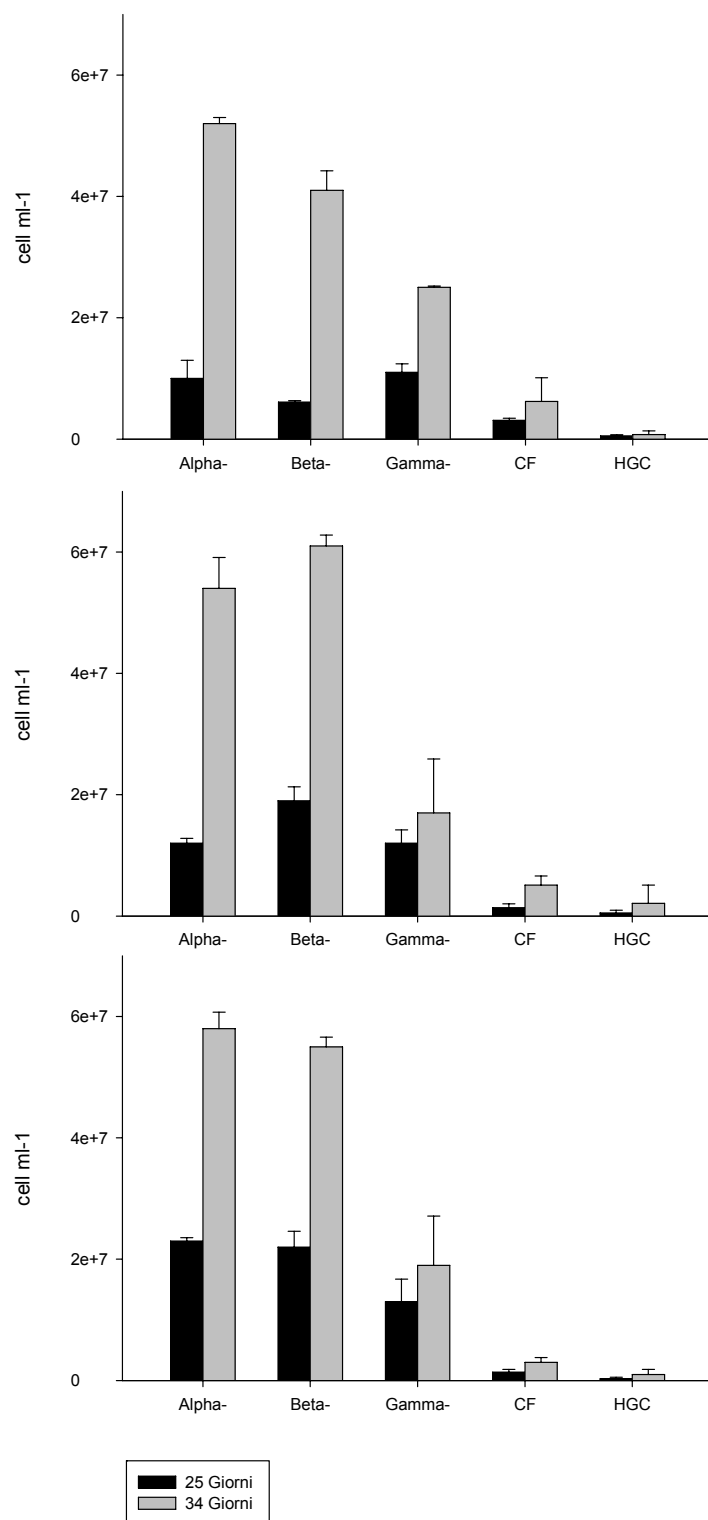


Fig. 3.2.4.1. Andamento delle abbondanze batteriche medie dei cinque gruppi analizzati a 25 e 34 giorni di accrescimento nei tre siti CB, MT ed SJD.

Dopo 34 giorni di accrescimento, si sono registrati dei significativi cambiamenti nella comunità microbica. Si assiste ad un dominio dei tre gruppi dei *Proteobacteria* in tutti i siti campionati. Nel sito CB, gli *Alpha*- prevalgono nel biofilm con valori pari a $5.2 \cdot 10^7 \pm 1.0 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹; i *Beta*- raggiungono un'abbondanza di $4.1 \cdot 10^7 \pm 3.2 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ ed i *Gamma*- presentano un valore pari a $2.5 \cdot 10^7 \pm 2.3 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹. Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* e degli *Actinobacteria* aumentano nel tempo raggiungendo un'abbondanza pari a $6.2 \cdot 10^6 \pm 3.9 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ e $7.4 \cdot 10^5 \pm 6.1 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹ rispettivamente. Nel sito intermedio MT, la comunità batterica nel biofilm è dominata dai gruppi: *Beta*- ($6.1 \cdot 10^7 \pm 1.8 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹), *Alpha*- ($5.4 \cdot 10^7 \pm 5.1 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹) e *Gamma-Proteobacteria* ($1.7 \cdot 10^7 \pm 8.9 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹). I *Cytophaga-Flavobacteria* e gli *Actinobacteria* aumentano nel tempo, rimanendo comunque i gruppi meno rappresentati all'interno della comunità microbica ($5.1 \cdot 10^6 \pm 1.5 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹, $2.1 \cdot 10^6 \pm 3.0 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹). Nel sito maggiormente sottoposto ad impatto, SJD, la comunità batterica continua ad essere dominata dagli *Alpha*- e dai *Beta-Proteobacteria* ($5.8 \cdot 10^7 \pm 2.7 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹, $5.5 \cdot 10^7 \pm 1.6 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹). I *Gamma-Proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* e gli *Actinobacteria* aumentano nel tempo mantenendo lo stesso andamento che presentavano a 25 giorni di accrescimento ($1.9 \cdot 10^7 \pm 8.1 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹, $3.0 \cdot 10^6 \pm 7.9 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹, $1.0 \cdot 10^6 \pm 8.5 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹). Il gruppo degli *Alpha*- tende a raggiungere un'elevata abbondanza batterica nel secondo campionamento trascorsi i 34 giorni di accrescimento; questo valore risulta essere in accordo con i lavori di Byron *et al.*, (1999), Manz *et al.*, (1999) e Webster *et al.*, (2004), in cui si dimostra la prevalenza del gruppo degli *Alpha*- in biofilm maturi. Un'alta abbondanza del gruppo degli *Alpha*- in biofilm fluviali viene evidenziata inoltre da Brummer *et al.*, (2000) e successivamente da O'Sullivan *et al.*, (2001), in uno studio effettuato nell'epilithon del fiume Taff (South Wales). Al contrario questo gruppo sembra raggiungere una densità minima in aggregati organici lotici (Bockelmann *et al.*, 2000). La dominanza degli *Alpha*- all'interno di biofilm fluviali è stata confermata in uno studio condotto da Anderson-Glenne *et al.*, (2008), in cui si osserva la tendenza di questo gruppo ad un accrescimento rapido nelle situazioni di forte competizione per le risorse (Fuchs *et al.*, 1997; Rubin *et al.*, 2007; Tien *et al.*, 2009). Al fine di comprendere se ci fossero dei cambiamenti significativi per questo gruppo nei tre siti e nei due tempi di campionamento, è stata effettuata un'analisi statistica della varianza a due vie (Two Way ANOVA). L'analisi ha messo in evidenza una differenza significativa tra i diversi livelli del fattore "Sito" ($F = 13.57$, $p < 0.01$) e del fattore "Tempo" ($F = 735.76$, $p < 0.01$) senza però mostrare una significatività tra i due fattori

(Sito x Tempo: $F = 2.39$, $p = 0.13$).

Il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* tende a prevalere nei sistemi di acqua dolce, in laghi oligotrofici e in corsi di acqua corrente (Alfreider *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1996; Glockner *et al.*, 1999; O'Sullivan *et al.*, 2001; Zwart *et al.*, 2002, 2003). Inoltre i *Beta*-sembrano dominare anche in aggregati organici lotici nel fiume Elba (Bockelmann *et al.*, 2000). Anche per il gruppo dei *Beta*- è stata effettuata un'analisi statistica ANOVA a due vie, considerando contemporaneamente l'abbondanza batterica dei *Beta*- nei tre siti e nei due tempi di campionamento (25 e 34 giorni). L'analisi ha mostrato una differenza significativa tra i diversi livelli del fattore "Sito" ($F = 108$, $p < 0.001$) e del fattore "Tempo" ($F = 1.316$, $p < 0.001$); si assiste inoltre ad una significativa interazione tra i due fattori (Sito x Tempo: $F = 8.94$, $p = 0.004$). I *Gamma-Proteobacteria* non raggiungono mai abbondanze molto elevate nei tre siti di campionamento, anche dopo i 34 giorni di accrescimento. Dati concordi con il nostro lavoro sono stati osservati nello studio di Brummer *et al.*, (2000) e Fazi *et al.*, (2005), in cui il gruppo dei *Gamma*- risulta non costituire una componente importante della comunità batterica in termini di abbondanza. Ulteriori conferme arrivano dagli studi di Manz *et al.*, (1999), Dang *et al.*, (2000) e MacDonald *et al.*, (2000), che hanno evidenziato le basse abbondanze del gruppo dei *Gamma-Proteobacteria*. L'analisi statistica ANOVA effettuata, considerando contemporaneamente l'abbondanza batterica del gruppo nei tre siti e nei due tempi di campionamento (25 e 34 giorni), non ha mostrato una differenza significativa tra i diversi livelli del fattore "Sito" ($F = 0.27$, $p = 0.76$); al contrario risulta essere significativa la differenza tra i diversi livelli del fattore "Tempo" ($F = 6.26$, $p = 0.02$). In ultimo, si assiste ad una interazione non significativa tra i due fattori (Sito x Tempo: $F = 0.48$, $p = 0.62$). Le abbondanze maggiori per il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria* si riscontrano nell'ultimo sito situato a monte del fiume e con ridotto impatto antropico (giorno 25). Di contro, nel sito S (34 giorni), a valle del fiume, i CF mostrano una minore abbondanza. L'analisi statistica effettuata (*Two Way* ANOVA) ha considerato contemporaneamente l'abbondanza batterica nei tre siti e nei due tempi di campionamento (25 e 34 giorni). L'analisi ha mostrato una differenza non significativa tra i diversi livelli del fattore "Sito" ($F = 0.98$, $p = 0.4$), mentre si assiste ad una differenza significativa tra i diversi livelli del fattore "Tempo" ($F = 8.65$, $p = 0.01$); infine non si osserva una significativa interazione tra i due fattori (Sito x Tempo: $F = 0.59$, $p = 0.56$). In ultimo, anche per il gruppo degli *Actinobacteria* è stata effettuata un'analisi statistica della varianza a due vie (*Two Way* ANOVA) considerando

contemporaneamente l'abbondanza batterica nei tre siti e nei due tempi di campionamento (25 e 34 giorni). L'analisi non ha mostrato differenze significative né tra i diversi livelli del fattore "Sito" ($F = 1.02$, $p = 0.38$) né del fattore "Tempo" ($F = 1.81$, $p = 0.2$). Anche nell'analisi che mette a confronto sito e tempo, non si assiste ad una significativa interazione tra i due fattori (Sito x Tempo: $F = 0.94$, $p = 0.41$).

3.2.5 Caratterizzazione della struttura dopo la traslocazione

La prima traslocazione è stata effettuata dalle acque del sito CB (Fig. 3.2.5.1) meno soggetto ad impatto, al sito MT.

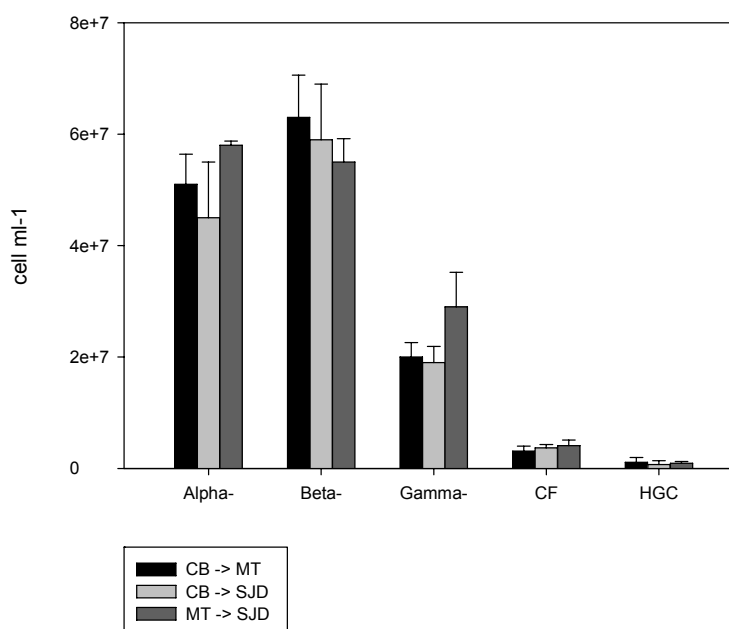


Fig. 3.2.5.1. Andamento dei diversi gruppi batterici in seguito alle tre traslocazioni: CB-MT, CB-SJD ed MT-SJD.

La comunità batterica del biofilm ha subito dei cambiamenti, con un aumento delle cellule appartenenti al gruppo dei *Beta-Proteobacteria* ($6.3 \cdot 10^7 \pm 7.6 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹), che così finiscono per prevalere nella comunità. I gruppi degli *Alpha-* e dei *Gamma-Proteobacteria* subiscono una lieve riduzione ($5.1 \cdot 10^7 \pm 5.4 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹, $2.0 \cdot 10^7 \pm 2.6 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹ rispettivamente). I *Cytophaga-Flavobacteria*, invece, subiscono una forte riduzione a seguito alla traslocazione ($3.1 \cdot 10^6 \pm 9.1 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹). Nella seconda traslocazione dalle acque meno inquinate a quelle più inquinate, (CB-SJD), si determinano cambiamenti più drastici rispetto alla traslocazione precedente.

Infatti, vi è una netta riduzione di tutti i gruppi batterici, fatta eccezione per il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* che, registrano un aumento raggiungendo un'abbondanza pari a $5.9 \cdot 10^7 \pm 1.0 \cdot 10^7$ cell ml⁻¹. Infine, nella terza traslocazione dal sito intermedio MT al sito SJD, la comunità batterica non mostra dei forti cambiamenti, infatti, per il gruppo degli *Alpha-*, dei *Beta-* e dei *Gamma-Proteobacteria* si registrano soltanto delle lievi modifiche in termini di abbondanza. Il gruppo dei *Cytophaga-Flavobacteria*, ($4.1 \cdot 10^6 \pm 1.1 \cdot 10^6$ cell ml⁻¹).

Successivamente alle diverse traslocazioni dal sito CB ai siti MT ed SJD, maggiormente impattati, il gruppo filogenetico degli *Alpha-Proteobacteria*, subisce una lieve variazione in termini di abbondanza. Infatti, i valori più alti per questo gruppo si registrano nel sito SJD e solamente dopo la traslocazione dal sito MT al sito SJD. In seguito all'ultima traslocazione, l'abbondanza batterica di questo gruppo tende a raggiungere le abbondanze degli *Alpha-* già presenti nel sito SJD, adattandosi quindi alle condizioni chimico-fisiche nel nuovo sito.

Nel corso dell'ultima traslocazione dal sito MT, mediamente impattato, al sito SJD, più impattato, il gruppo dei *Beta-* è soggetto ad una lieve riduzione, uniformandosi così ai valori osservati nel sito SJD. Questo gruppo filogenetico tende a diminuire in seguito alle traslocazioni dal sito CB meno inquinato ai siti MT ed SJD maggiormente impattati. Nella traslocazione, dal sito MT al sito SJD, i *Gamma-* subiscono un aumento della loro abbondanza, tendendo ad uniformarsi ai valori di abbondanza già registrati nel sito SJD. Il gruppo filogenetico dei *Cytophaga-Flavobacteria* mostra in tutte le traslocazioni una riduzione dell'abbondanza batterica. In particolare, una diminuzione si evidenzia nel passaggio dal sito meno inquinato CB ai siti MT ed SJD fortemente impattati, a supporre una minore resistenza alle elevate concentrazioni di inquinanti presenti nei siti a valle del fiume. I dati ottenuti sembrano confrontabili, inoltre, con quanto riportato da Bockelmann *et al.*, (2000) e O'Sullivan *et al.*, (2001) e in cui si evidenzia una bassa abbondanza dei *Cytophaga-Flavobacteria* rispetto al totale dei *Proteobacteria*. Dopo la traslocazione dalle acque del sito MT alle acque sito più impattato SJD, gli *Actinobacteria* subiscono una riduzione della loro abbondanza raggiungendo un valore di $9.1 \cdot 10^5 \pm 3.5 \cdot 10^5$ cell ml⁻¹.

3.2.6 Conclusioni del capitolo

Questa parte del lavoro di Tesi ha permesso di studiare, attraverso la tecnica CARD-FISH, la variazione della composizione della comunità microbica in biofilm sottoposti ad un diverso impatto antropico. I risultati mostrano come i gruppi batterici considerati presentino degli andamenti differenti sia lungo il gradiente di inquinamento monte-valle sia nel tempo. Trascorsi 25 giorni di accrescimento, l'abbondanza batterica mostra dei valori minimi nel sito soggetto ad un minore impatto antropico (CB) mentre nei siti maggiormente inquinati (MT, SJD), l'abbondanza microbica raggiunge valori significativamente più alti. Inoltre, è possibile osservare, come nel sito CB, il meno impattato, la comunità abbia una più omogenea distribuzione dei gruppi filogenetici analizzati, mentre nei siti MT ed SJD prevalgono i gruppi degli *Alpha*- e dei *Beta-Proteobacteria*. Dopo 34 giorni, le abbondanze batteriche raggiungono valori simili in tutti i tre siti con un aumento soprattutto degli *Alpha*- e *Beta-Proteobacteria*. Tali risultati sono in linea con quanto osservato dai lavori di Battin *et al.*, (2007), in cui è riportato come durante le fasi iniziali di sviluppo di biofilm la comunità presenti una maggiore diversità rispetto alle fasi di maturazione in cui i microrganismi più competitivi tendono a prevalere sugli altri. Per comprendere come le dinamiche della comunità batterica rispondono al diverso grado di inquinamento fluviale si è proceduto alla traslocazione dei biofilm dalle acque dei siti meno contaminati a quelli maggiormente inquinati. Così facendo si è potuto valutare, in una comunità microbica matura, il cambiamento sia in termini dell'abbondanza che della distribuzione batterica. Infatti, nonostante le differenze iniziali, già dopo 9 giorni dalla traslocazione le comunità batteriche tendono ad assomigliare nella struttura alle comunità cresciute nei siti più inquinati. Nella traslocazione dal sito meno impattato (CB) al sito di medio impatto (MT), è possibile osservare un aumento del gruppo dei *Beta-Proteobacteria* ed una riduzione dei *Cytophaga-Flavobacteria*. Questi risultati sono in linea con diversi studi in cui i *Beta-Proteobacteria* sono strettamente correlati con l'aumento delle sostanze inquinanti (Glockner *et al.*, 1999; O'Sullivan *et al.*, 2001; Zwart *et al.*, 2002, 2003; Brummer *et al.*, 2003). Nelle traslocazioni dai siti CB ed MT al sito maggiormente impattato SJD, le comunità microbiche subiscono cambiamenti ancor più accentuati, a conferma di quanto le condizioni ambientali possano indurre le comunità microbiche ad adattarsi al nuovo ambiente. Questi risultati mostrano come le caratteristiche qualitative

delle acque rappresentino un fattore estremamente importante nella strutturazione delle comunità microbiche bentoniche.

3.3 Ottimizzazione del protocollo CARD-FISH per l'analisi della comunità batterica in biofilm

Scopo di questa parte del progetto di Dottorato, è stato quello di ottimizzare il protocollo CARD-FISH, in combinazione con la microscopia confocale a scansione (CLSM) per l'ibridizzazione e lo studio del biofilm direttamente attaccato al suo substrato originale. E' stato possibile così identificare e localizzare le cellule mantenendo inalterata la naturale architettura del biofilm. Ad oggi, molti studi dettagliati sulla composizione delle comunità microbiche associate ai biofilm, sono stati generalmente effettuati attraverso un campionamento distruttivo con la rimozione del biofilm dal substrato di origine, con potenziale perdita di biomassa e distorsione della prospettiva *in situ* (DeLattola *et al.*, 2009). Le tecniche fino ad oggi utilizzate prevedono, infatti, il raschiamento, la centrifugazione o la filtrazione dell'aggregato, impedendo così di avere delle informazioni sulla struttura spaziale del biofilm. Moratò e colleghi (2004) in uno studio sul monitoraggio di biofilm acquatici, hanno applicato la tecnica del congelamento del biofilm (*cryoembedding*). Tale tecnica prevede un congelamento del biofilm e il successivo taglio in sottili sezioni (*cryosectioning*) mantenendo l'integrità strutturale del biofilm, ma solamente a livello delle singole sezioni del campione e non nella sua totalità (Huang *et al.*, 1996).

3.3.1 CARD-FISH su biofilm

Per la messa a punto della tecnica di ibridizzazione su biofilm batterici è stato allestito un mesocosmo sperimentale con acqua di fiume (100 litri), del sedimento (4kg) e delle pietre. Successivamente ad un periodo di acclimatazione di un mese, i substrati artificiali rappresentati da vetrini per microscopia con pozzetti, sono stati immersi nel mesocosmo a temperatura ambiente in condizione di luce naturale e sono stati raccolti rispettivamente dopo 5, 20 e 40 giorni. I vetrini sono caratterizzati da 10 pozzetti con un diametro di 6,7 millimetri ciascuno (Thermo Scientific, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Germania). Subito dopo la raccolta del vetrino dal mesocosmo è stata effettuata la pulizia della superficie intorno ai pozzetti con un piccolo tampone al fine di rimuovere il biofilm eventualmente cresciuto tra un pozzetto e l'altro. I vetrini sono stati poi fissati in formalina (concentrazione finale 2% per 2h a 4 °C) in una Falcon da 50 ml; in seguito ogni singolo pozzetto è stato ricoperto con uno strato di agarosio (Invitrogen

Life Technologies) per evitare eventuale perdita di cellule. I vetrini, una volta asciugati a 37 °C per circa 10 minuti, sono stati disidratati in una soluzione di etanolo al 96% e poi inseriti in MQ per un minuto. A questa fase di fissazione, è seguita una fase di permeabilizzazione, utilizzando una soluzione di Lisozima [20 mg di lisozima, (FLUKA Analitica, Germania), 400 µl EDTA 0.5 M (pH 8.0), 200 µl Tris-HCl (pH 7.4), 1400 µl acqua autoclavata MQ] che è stata aggiunta nei singoli pozzetti formando una *goccia*, al fine di mantenere all'interno del pozzetto le condizioni ideali per la permeabilizzazione (Fig. 3.3.1.1). Il vetrino è stato poi incubato per 1h a 37° C in una Falcon da 50ml, inserendo all'interno della carta imbevuta di acqua MQ e della restante soluzione di Lisozima per mantenere un buon grado di umidità ed evitare un eccessivo essiccamento delle soluzioni poste sui pozzetti. Successivamente alla prima permeabilizzazione, e dopo un lavaggio in acqua MQ, è stata eseguita una seconda fase di permeabilizzazione della parete cellulare, attraverso l'utilizzo di Proteinasi K, una serina proteasi, (SIGMA – Aldrich, Germania). Come per il lisozima, anche in questo passaggio sono state aggiunte delle gocce di 30 µl di soluzione di Proteinasi K [0.034 U/µl in TE] su ciascun pozzetto ed i vetrini sono stati incubati in una fiala Falcon umidificata per 25 minuti a 37° C. I campioni, successivamente alle due fasi di permeabilizzazione, sono stati lavati in acqua MQ per 1 minuto e incubati in 0.01 M HCl (10 minuti a temperatura ambiente) per inattivare le perossidasi endogene. Per la fase di ibridazione sono state utilizzate tre sonde oligonucleotidiche 16S rRNA marcate con la perossidasi HRP (Biomers, Ulm, Germania): *Bacteria* (EUB I-III), *Alpha-Proteobacteria* (ALF968), *Beta-Proteobacteria* (BET42A), *Gamma-Proteobacteria* (GAM42a).

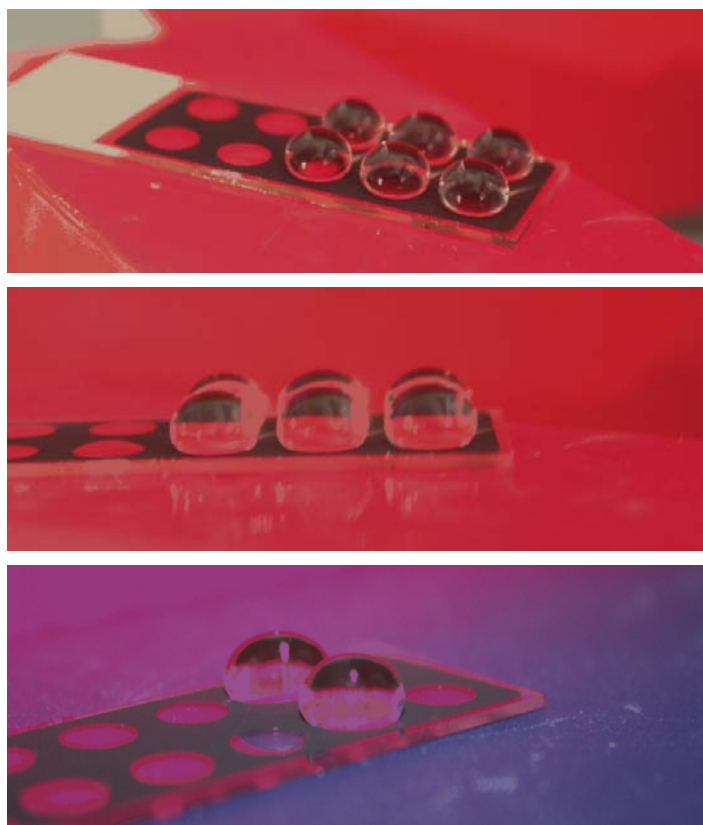


Fig. 3.3.1.1 Fasi di permeabilizzazione ed ibridazione delle comunità batteriche “*attached*” durante l’applicazione del protocollo CARD-FISH.

Dopo la fase di ibridazione, i vetrini sono stati immersi in un tampone di lavaggio preriscaldato (NaCl 5M; 1M Tris-HCl pH 7.4; 0.5M EDTA pH 8.0; 20% sodiododecilsolfato SDS; MQ), allo scopo di rimuovere la Formammide e stabilizzare l'appaiamento delle sonde.

Per la fase di amplificazione del segnale è stato preparato un tampone di amplificazione di 1000 μ l (30% H₂O₂; 1x PBS pH 7.4; 5M NaCl; 10% Blocking Reagent; Dextran Sulfate) al quale sono stati aggiunti 2 μ l di tirammide marcata con fluoresceina (SIGMA – Aldrich, Germania). Come per i passaggi precedenti per ogni pozzetto sono state formate delle *gocce* di 40 μ l ciascuna ed il vetrino è stato posizionato in una provetta da 50 ml con all'interno della carta umidificata con un surplus di soluzione tampone.

Il vetrino è stato poi lavato per 1 minuto prima in MQ e poi in etanolo 96% e lasciato asciugare a temperatura ambiente ed al buio. Infine è stata posizionata sul vetrino una soluzione miscela di 4', 6-diammino -2- phenylindole (DAPI) con Vectashield (1 μ g/ml) e protetto da vetrini coprioggetto. I campioni sono stati conservati al buio a -20 °C fino al momento della lettura al microscopio ad epifluorescenza, effettuata tramite i filtri Leica A (DAPI) e Leica 13 (FLU). Per studiare l'accrescimento del biofilm, si è utilizzato anche il microscopio confocale a scansione laser (CLSM) Leica TSC-SP2 (Leica Microsystem Heidelberg GmbH, Mannheim, Germany). L'acquisizione di immagini lungo l'asse verticale del campione ha consentito di ricostruire la struttura tridimensionale complessiva dell'intera area. Almeno tre serie di immagini RGB sono state acquisite dal microscopio confocale (tre immagini per ogni pozzetto, 512x512 pixel, 0.01 μ m/pixel). I diametri del foro stenopeico del CLSM sono stati adattati in modo tale che ogni immagine acquisita rappresenti una sezione ottica dello spessore di 0.167 μ m. In questo modo è stato possibile stimare lo spessore del biofilm considerando la distanza tra il minimo e il massimo dell'immagine catturata con il primo e ultimo segnale fluorescente su fondo nero. Successivamente l'analisi delle immagini, acquisite dal CLSM, è stata effettuata per mezzo del software NHI ImageJ v.1.43.u (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Tutte le immagini della serie sono state preparate per un'analisi separata dei canali di colore RGB. I canali di colore rosso e verde sono stati separati e le risultanti delle due immagini sono state combinate al fine di generare automaticamente immagini binarie per l'elaborazione automatica.

3.3.2 Struttura della comunità batterica nei biofilm

L'analisi statistica ANOVA ($F = 1.365$, $p = 0.213$), effettuata sulle abbondanze delle cellule batteriche (ibridizzate con sonde EUB I-III) nei 10 pozzetti di uno stesso vetrino, non ha evidenziato differenze significative confermando quindi uno sviluppo omogeneo del biofilm tra tutti i pozzetti del vetrino. La crescita dell'aggregato non è quindi relazionata con la posizione del pozzetto sul vetrino. Tale risultato ha permesso quindi di considerare ogni pozzetto come una singola replica e applicare le differenti sonde oligonucleotidiche in almeno tre pozzetti dello stesso vetrino. L'impiego della microscopia ad epifluorescenza ha permesso di analizzare la struttura e l'accrescimento della comunità batterica all'interno del biofilm, in termini di numero di cellule per millimetro quadrato (Fig. 3.3.2.1 e Fig. 3.3.2.2). L'analisi ANOVA ($0.14 < p < 0.23$), effettuata sulle abbondanze dei gruppi *Alpha-Proteobacteria*, *Beta-Proteobacteria* e *Gamma-Proteobacteria* tra i 10 pozzetti, anche in questo non ha caso evidenziato differenze significative confermando quindi uno sviluppo omogeneo tra tutti i pozzetti del vetrino. Dopo 5 giorni di accrescimento è possibile osservare un'abbondanza batterica molto simile per i tre gruppi degli *Alpha*-, *Beta*- e *Gamma-Proteobacteria* ($5.68 \cdot 10^3 \pm 1.1 \cdot 10^3$ cell/mm², $6.54 \cdot 10^3 \pm 1.2 \cdot 10^3$ cell/mm², $5.68 \cdot 10^3 \pm 1.9 \cdot 10^3$ cell/mm²). Dopo 20 giorni di accrescimento l'abbondanza dei gruppi filogenetici risulta aumentata, con valori più alti osservati per i *Beta-Proteobacteria* ($4.06 \cdot 10^4 \pm 8.0 \cdot 10^3$ cell/mm²) tipici di sistemi di acque dolci e salmastre. Questi risultati trovano conferma nei lavori di Manz *et al.* (1999), in cui si osserva come, durante lo sviluppo iniziale del biofilm (a circa 7 giorni), il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* tende a prevalere.

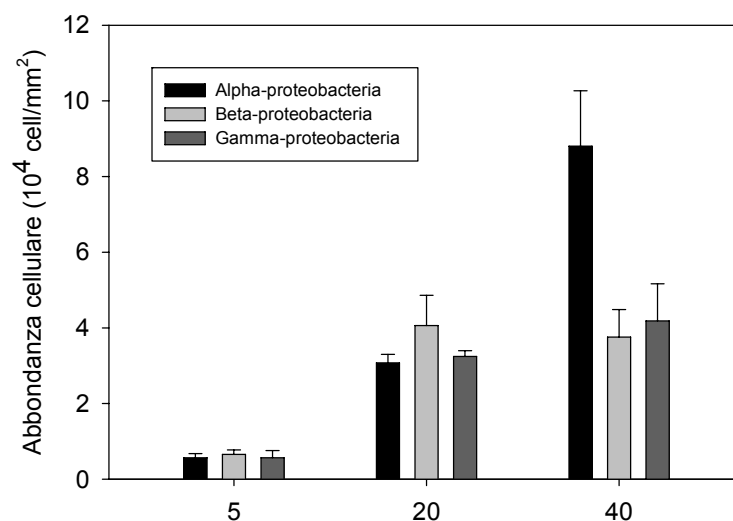


Fig. 3.3.2.1. Andamento dell'abbondanza batterica dei tre gruppi analizzati rispettivamente a 5, 20 e 40 giorni di accrescimento (conte al microscopio ad epifluorescenza).

Al giorno 40, il gruppo filogenetico degli *Alpha-Proteobacteria* raggiunge un'abbondanza pari a $8.80 \cdot 10^4 \pm 1.5 \cdot 10^4$ cell/mm², risultando in questo modo il gruppo dominante all'interno della comunità batterica nel biofilm. I nostri risultati concordano con quanto osservato da Manz e colleghi, che hanno osservato una dominanza di questo gruppo all'interno della comunità microbica del biofilm più maturo.

Il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* non subisce dei cambiamenti considerevoli mantenendosi con valori di abbondanza simile al campionamento precedente, con un valore pari a $3.75 \cdot 10^4 \pm 7.28 \cdot 10^3$ cell/mm². In ultimo, per il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* si evidenzia una crescita molto graduale ma costante nel corso dell'esperimento, partendo da un'abbondanza minima di $5.68 \cdot 10^3 \pm 1.90 \cdot 10^3$ cell/mm² (5 giorni) e raggiungendo un valore massimo di $4.19 \cdot 10^4 \pm 9.8 \cdot 10^3$ cell/mm².

L'utilizzo della microscopia confocale a scansione laser (CLSM), e delle immagini digitali ottenute, ha permesso di osservare la distribuzione spatio-temporale dei gruppi batterici a 5, 20 e 40 giorni di crescita. La Fig. 3.3.2.2 mostra l'andamento dei tre gruppi batterici in termini di percentuale di superficie occupata dalla sonda rispetto alla superficie totale del biofilm. Durante lo sviluppo iniziale del biofilm (giorno 5), i *Beta-Proteobacteria* coprono una superficie media del $7 \pm 0.78\%$, seguiti dagli *Alpha-* con una superficie media pari a $5 \pm 4.97\%$; in ultimo i *Gamma-Proteobacteria* raggiungono un valore minimo del $4 \pm 1.17\%$. Al giorno 20, le aree occupate dai gruppi batterici *Alpha-* e *Beta-Proteobacteria*, aumentano gradualmente ($18 \pm 7.95\%$ per gli *Alpha-*, $12 \pm 1.13\%$ per

i *Beta*-) mentre i *Gamma-Proteobacteria* tendono a mantenersi stabili ($3.5 \pm 1.17\%$). Al giorno 40, termine dell'esperimento, il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* coprono un'area simile al campionamento precedente ($12 \pm 9.21\%$); gli *Alpha-Proteobacteria* tendono ad aumentare raggiungendo un'area del $26 \pm 15.38\%$ dominando la comunità batterica nel biofilm. In ultimo, il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* a 40 giorni ha un'estensione di superficie pari a $6 \pm 2.74\%$.

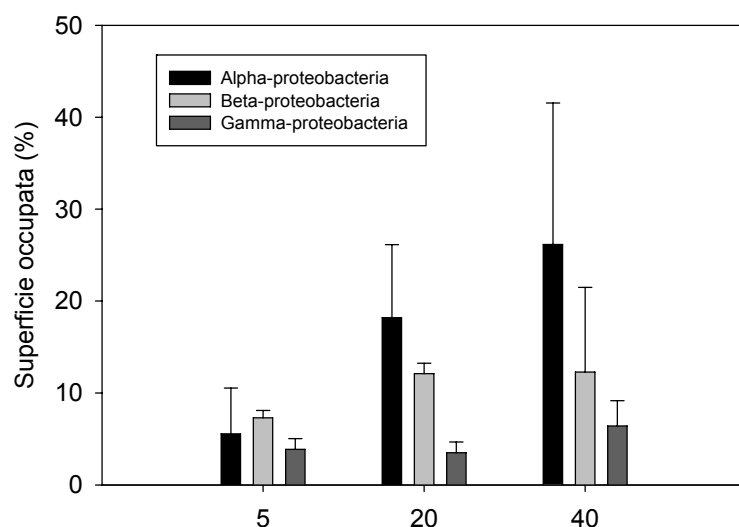


Fig. 3.3.2.2. Andamento biomassa batterica dei tre gruppi analizzati (espressi come percentuale di superficie occupata, CLSM).

Le analisi delle immagini ottenute con la microscopia confocale sulla distribuzione dei tre gruppi batterici (Fig. 3.3.2.2), mostrano come dopo 5 giorni di immersione, le cellule dei *Beta-Proteobacteria* tendono ad aggregarsi tra loro dando vita ad una matrice densa (EPS), mentre i gruppi degli *Alpha*- e *Gamma-Proteobacteria* danno vita ad una colonizzazione del biofilm con cellule isolate e disperse. Inoltre, con l'utilizzo del software ImageJ è stato possibile ricostruire la struttura tridimensionale del biofilm come mostrato in figura 3.3.2.3.

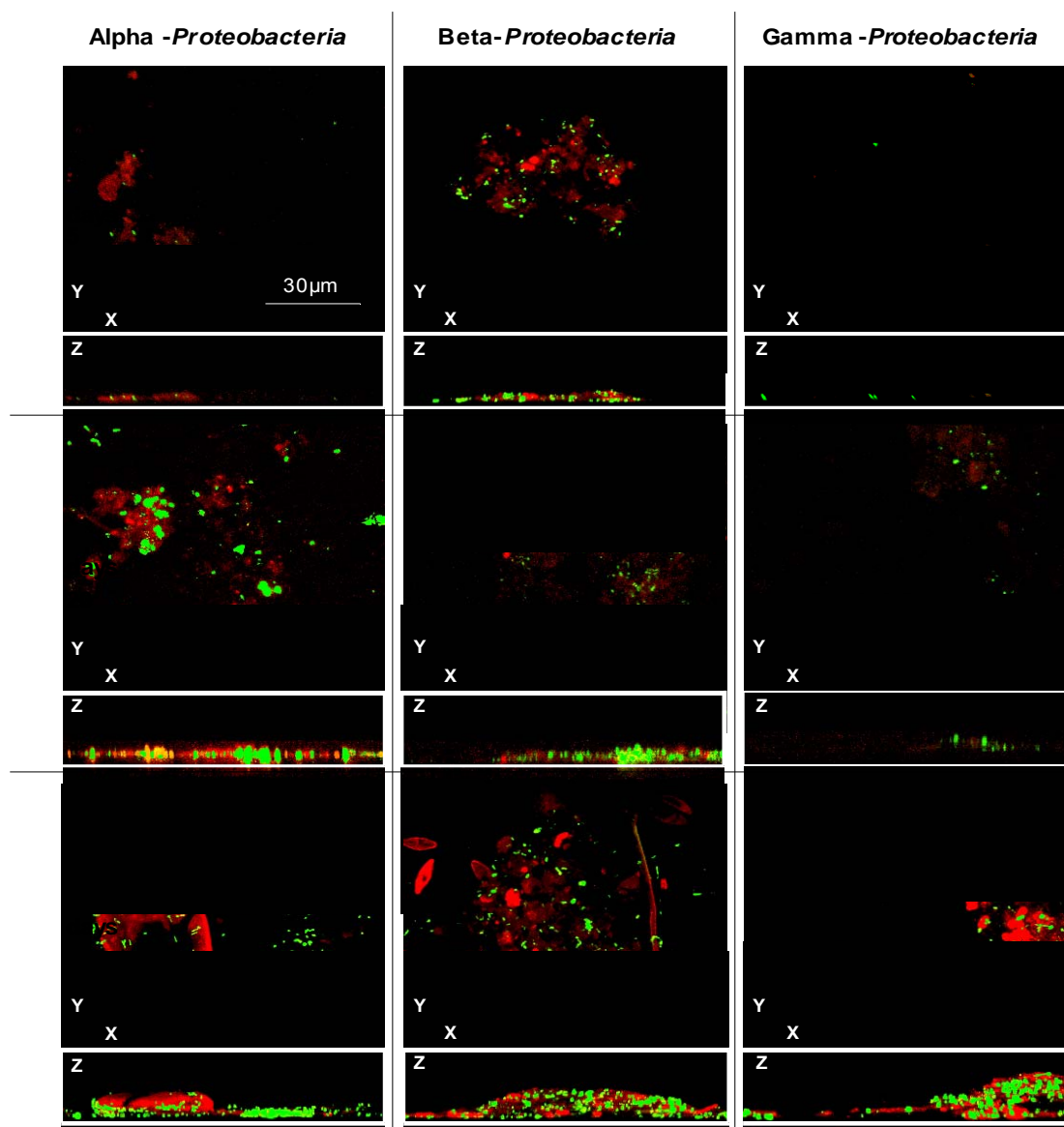


Fig. 3.3.2.3. Foto combinate e ricostruzione tridimensionale ottenute dal microscopio confocale a scansione laser (CLSM).

L'osservazione al microscopio confocale ha inoltre permesso di calcolare lo spessore del biofilm durante le diverse fasi dell'accrescimento (Fig. 3.3.3.1). Trascorsi 5 giorni dall'immersione, il biofilm ha uno spessore compreso tra 4.5 μ m e 6.5 μ m di profondità. Nel corso dell'accrescimento, al giorno 20, si evidenzia un biofilm molto più compatto e stabile, con valori compresi tra i 10 μ m e 12 μ m. Il valore massimo di spessore (16 μ m) si è registrato alla fine dell'esperimento (giorno 40).

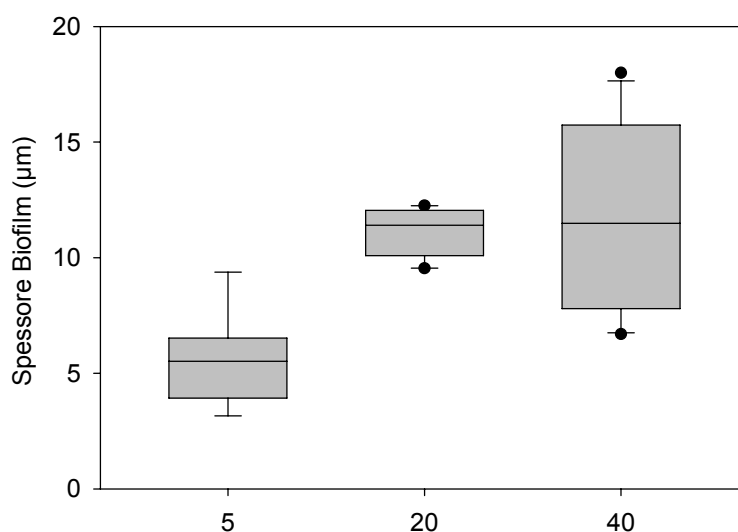


Fig. 3.3.3.1 Andamento delle spessore del biofilm a 5, 20 e 40 giorni di accrescimento.

Questi dati concordano anche con i risultati ottenuti da Battin *et al.*, (2003), dove si evidenzia che, contemporaneamente all'aumento dello spessore, si ha anche un aumento della porosità dell'aggregato; questi aumenti di porosità, rappresentati da dei canali vuoti, sono necessari per migliorare ed agevolare il trasporto delle sostanze nutritive verso gli strati inferiori del biofilm.

Diversi studi confermano che il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* tende a dominare nei sistemi di acqua dolce, in laghi oligotrofici e in corsi di acqua corrente (Alfreider *et al.*, 1996; Manz *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1996). In particolar modo, i *Beta-Proteobacteria* sono stati identificati come il gruppo più abbondante nei corsi d'acqua (Glockner *et al.*, 2000; Brummer *et al.*, 2003; Loy *et al.*, 2005; Besemer *et al.*, 2007). Araya e colleghi (2003) hanno suggerito da parte del gruppo filogenetico dei *Beta-Proteobacteria* una maggiore facilità nell'attaccare più facilmente i substrati durante la formazione iniziale del biofilm rispetto agli altri gruppi con una maggiore tendenza quindi a dominare durante la prima parte della successione batterica, come si è riscontrato dalle analisi

precedenti (Fig. 3.3.2.2 e 3.3.2.3). Inoltre, ulteriori studi condotti da Manz *et al.*, (1999) hanno evidenziato come il gruppo dei *Beta-Proteobacteria* domini nella comunità batterica durante lo sviluppo iniziale dell'aggregato. Di contro, per il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* si osserva un aumento costante durante tutto lo svolgimento dell'esperimento, sia in termini di area fluorescente occupata, sia in numero di cellule, dominando l'intera comunità batterica al termine dell'esperimento al giorno 40. Questo risultato trova conferma negli studi effettuati da Manz *et al.*, (1999), Dang *et al.*, (2000) e Webster *et al.*, (2003) in cui si evidenzia come il gruppo degli *Alpha-Proteobacteria* prevalga principalmente in un biofilm maturo. In ultimo, il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* mostra, a differenza degli altri gruppi considerati, un accrescimento molto lento ma costante nel corso dell'esperimento, presentando così, alla conclusione dell'esperimento, una abbondanza inferiore rispetto agli altri due gruppi considerati. Altri studi condotti da Brummer *et al.*, (2000), hanno dimostrato come il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* non costituisca una componente importante della comunità all'interno del biofilm in termini di abbondanza. Ulteriore conferma al dato osservato è mostrata nei lavori di Dang e colleghi (2001), in cui si evidenzia come il gruppo dei *Gamma-Proteobacteria* non presenti elevate abbondanze e non formi colonie particolarmente estese sui vetrini. Per quanto riguarda i valori di densità batterica osservata durante lo sviluppo del biofilm, i lavori di Manz *et al.*, (1999) e di Mac Donald *et al.*, (2000) confermano i dati osservati in questo esperimento.

3.3.3 Conclusioni del capitolo

L'ottimizzazione del protocollo della *Catalyzed Reported Deposition-Fluorescence in situ Hybridization* (CARD-FISH) ha permesso di seguire la dinamica di tre gruppi batterici (*Alpha*-, *Beta*- e *Gamma-Proteobacteria*) durante l'accrescimento di biofilm. Inoltre, attraverso l'utilizzo del CLSM, è stato possibile visualizzare la struttura tridimensionale dell'aggregato e l'esatta localizzazione delle cellule batteriche durante le fasi di accrescimento. Nel passato, molte delle informazioni relative l'architettura del biofilm e la distribuzione spaziale dei diversi ceppi batterici venivano perse con l'applicazione di tecniche che prevedono il raschiamento, la centrifugazione o la crio-sectioning dell'aggregato. Tale lavoro ha quindi permesso, di seguire la dinamica spaziotemporale dei diversi gruppi batterici e di studiare come la comunità microbica si vada strutturando durante le prime fasi di sviluppo del biofilm. La distribuzione spaziale dei

diversi ceppi all'interno della matrice polimerica extracellulare ha sicuramente forti implicazioni sulle capacità di sviluppo e resistenza ai diversi fattori di stress. Come noto, la matrice polisaccaridica, per esempio, svolge un ruolo rilevante nella resistenza delle cellule batteriche ad agenti antimicrobici (Nicholas *et al.*, 1994; Morton *et al.*, 1998). La possibilità di visualizzare singoli ceppi batterici all'interno della struttura tridimensionale del biofilm durante le fasi di sviluppo, può anche avere forti implicazione nel campo dell'ecologia di base, aumentando le conoscenze sulle successioni microbiche. Negli ultimi anni, infatti, grazie ai recenti progressi nelle applicazioni di tecniche molecolari, molti studi si stanno focalizzando sui meccanismi che regolano le successioni dei microrganismi (Fierer *et al.*, 2010). Risulta, inoltre, fondamentale poter analizzare la distribuzione spaziale e temporale dei batteri nel biofilm e capirne le dinamiche di formazione e sviluppo dal momento che tali biofilm hanno anche un importante ruolo sia in campo industriale, che in quello della depurazione delle acque e del biorisanamento.

Referenze

- Abell, G. C., Bowman, J. P., 2005. Ecological and biogeographic relationships of class *Flavobacteria* in the Southern Ocean. *FEMS Microbiol. Ecol.* 51: 265–277.
- Abreu, P.C., Odebrecht, C., Gonzales, A., 1994. Particulate and dissolved phytoplankton production of the patos lagoon estuary, southern Brazil – comparison of methods and influencing factors. *Jour. of Plankton Research* 16 (7), 737-753.
- Acinas, S.G., Anton, J., Rodriguez-Valera, F., 1999. Diversity of free-living and attached bacteria in offshore Western Mediterranean waters as depicted by analysis of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 514-522.
- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F.O., Wille, A., Psenner, R., 1996. Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2138-2144.
- Allgaier, M., Grossart, H.P., 2006. Diversity and Seasonal Dynamics of Actinobacteria Populations in Four Lakes in Northeastern Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(5): 3489-3497.
- Alonso-Saez, L., Balagué, V., Sà, E.L., Sanchez, O., Gonzalez, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedros-Aliò, C., Gasol, J.M., 2007. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbial Ecol.* 60: 98-112.
- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990b. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Bacteriol.* 172: 762-770.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Reviews.* 59(1): 143-169.
- Amann, R.I., Kuhl, M., 1998. In situ for assessment of microorganisms and their activities. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 352-358.
- Amann, R.I., Ludwig, W., 2000. Ribosomal RNA-targeted nucleic acid probes for studies in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 555-565.
- Anderson-Glenna, M.J., Vegar Bakkenstuen, N., Clipson, J.W., 2008. Spatial and temporal variability in epilithic biofilm bacterial communities along an upland river gradient. *Microbiol. Ecol.* 64: 407-418.
- Araya, R., Katsuji, T., Takagi, T., Yamaguchi, N., Nasu, M., 2003. Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43: 11-119.

- Artegiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F., Russo, A., 1997. Adriatic Sea General Circulation. Part I: Air-Sea interactions and Water Mass Structure. *Jour. of Physical Oceanography*. 27.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Azam, F., 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: the plot thickens. *Science* 280: 694-696.
- Barcina, I., Lebaron, P., VivesRego, J., 1997. Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: A biological approach. *FEMS Microbiol. Ecol.* 23 (1), 1-9.
- Battin, T.J., Sengschmitt, D., 1999. Linking sediment Biofilms, hydrodynamics, and river bed clogging: evidence from a large river. *Microb. Ecol.* 37: 185-196.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., Hansen, C., 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 5443-5452.
- Battin, T.J., Sloan, W.T., Kjelleberg, S., Daims, H., Head, I.M., Curtis, T.P., Eberl, L., 2007. Microbial landscapes: new paths to biofilm research. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:7-12.
- Bernhard, A., Colbert, D., McManus, J., 2005. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. *FEMS Microbiol. Ecol.* 52: 115-128.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.K., Hochedlinger, G., Hodl, I., Baranyi, C., Battin, T.J., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 4966-4974.
- Bocklemann, U., Manz, W., Neu, T.R., Szewzyk, U., 2000. Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates (river snow) in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 157-170.
- Bonnineau, C., Guasch, H., Proia, L., Ricart, M., Geislinger, A., Romani, A.M., Sabater, S., 2010. Fluvial biofilm: a pertinent to assess B-blockers toxicity. *Aquat. Toxicol.* 96:225-233.
- Berneman, J., 1999. Culture-Independent Identification of Microorganisms That Respond to Specified Stimuli. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(8): 3398-3400.
- Bratbak, G., Heldal, M., Norland, S., Thingstad, T.F., 1990. Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(5): 1400-1405.
- Brock, T.D., Madigan, M.D., Martiniko, J.M., Parker, J., 2003. *Biologia dei Microrganismi*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.

- Brümmer, I.H.M., Fehr, W., Wagner-Döbler, I., 2000. Biofilm community structure in polluted river: Abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3078-3082.
- Brummer, I.H.M., Felske, A., Wagner-Dobler, I., 2003. Diversity and seasonal variability of *Beta-proteobacteria* in biofilm of polluted rivers: analysis by temperature gradient gel electrophoresis and cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4463-4473.
- Bull, A.T., Goodfellow, M., Slater, J.H., 1992. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annu. Rev. Microbiol.* 46: 219-252.
- Byron, C., Crump, E., Armbrust, V., Baross, J.A., 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, Its Estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbol.* p. 3192-3204.
- Castel, J., Cuamette, P., Herbert, R., 1996. Eutrophication gradients in coastal lagoons as exemplified by the Bassin d'Arcachon and the Etang du Prevost. *Hydrobiologia* 329 (1-3), R9-R28.
- Cherrier, J., Bauer, J.E., Druffel, E., 1996. Utilization and turnover of labile dissolved organic matter by bacterial heterotrophs in eastern North Pacific surface waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 139: 267-279.
- Cho, B.C., Azam, F., 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63: 253-259.
- Connon, S.A., Giovannoni, S.J., 2002. High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3878-3885.
- Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2000. Natural assemblages of marine proteobacteria and members of the *Cytophaga-Flavobacter* cluster consuming low- and highmolecular-weight dissolved organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(4): 1692-1697
- Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5116-5122.
- Coveney, M.F., Wetzell, R.G., 1992. Effect of nutrients on specific growth rate of bacterioplankton in oligotrophic lake water cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, n.1 150-156.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V., Baross, J.A., 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 3192-3204.
- Crump, B.C., Hopkinson, C.S., Sogin, M.L., Hobbie, J.E., 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 3 1494-1505.

- Dang, H., Lovell, C.R., 2000. Bacterial primary colonization and early succession in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16s rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 467-475.
- De Figueiredo, D.R., Pereira, M.J., Moura, A., Silva, L., Barrios, S., Fonseca, F., Henriques, I., Correia, A., 2007. Bacterial community composition over a dry winter in meso- and eutrophic Portuguese water bodies. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 638-650.
- Degobbis, D., Gilmartin, M., 1990. Nitrogen, phosphorus and biogenic silicon budgets for the northern Adriatic Sea. *Ocean Acta* 13, n.1, 31-45.
- Degobbis, D., Precali, R., Ivanic, I., Smodiaka, N., Fuks, D., Kveder, S., 2000. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *Intern Journ. Environ. and Pollut.* 13, n.1-6, 495-533.
- Delatolla, R., Tufenkji, N., Comeau, Y., Lamarre, D., Gadbois, A., Berk, D., 2009. In situ characterization of nitrifying biofilm: Minimizing biomass loss and preserving perspective. *Water Res.* 43: 1775-1787.
- Del Giorgio, P.A., Bird, D.F., Prairie, Y.T., Planas, D., 1996. The flow cytometric determination of bacterial abundance in lake plankton using the green nucleic acid stain SYTO 13. *Limnol. Oceanogr.* 41: 783-789.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S., Pace, N.R., 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells. *Science* 243: 1360-1363.
- DeLong, E.F., 2006 Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science.* 311, 496-503.
- Dorigo, U., Volatier, L., Humbert, J.F., 2005. Molecular approaches to the assessment of biodiversity in aquatic microbial communities. *Water. Res.* 39: 2207-2218.
- Dworkin, M., 1991. Microbial cell-cell interactions. p.1-6 American society for Microbiology, Washington, D.C.
- Ducklow, H.W., Carlson, C.A., 1992. Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology* 12, 113-181.
- Ettoumi, B., Bouhaja, E., Borinb, S., Daffonchiob, D., Boudabousa, A., Cherifa, A., 2010. Gamma-Proteobacteria occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea sediments as revealed by cultivation-dependent and -independent approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 222-231.
- Eyre, B.D., Ferguson, A.J., 2002. Comparison of carbon production and decomposition, benthic flux and denitrification in seagrass, phytoplankton, benthic microalgae- and macroalgae- dominated warm-temperate Australian lagoons. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229: 43-59.

- Fazi, S., Amalfitano, S., Pernthaler, J., Puddu, A., 2005. Bacterial communities associated with benthonic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environ. Microbiol.* 7:1633-1640.
- Fazi, S., Amalfitano, S., Piccini, C., Zoppini, A., Puddu, A., Pernthaler, J., 2008. Colonization of overlaying water by bacteria from dry river sediment. *Environ. Microbiol.* 10: 2760-2772.
- Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., Craine, J.M., 2010. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Res. Microbiol.* 161, 635-642
- Fuchs, G., Heider, J., 1997. Microbial anaerobic aromatic metabolism anaerobe. *Microb. Ecol.* 3: 1-22.
- Fuchs, B.M., Zubkov, V., Sahm, K., Burkill, P.H., Amann, R., 2000. Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by cytometric and molecular biological techniques. *Environ. Microbiol.* 2(2): 191-201.
- Fuchs, B.M., Woebke, D., Zubkov, V., Burkill, P., Amann, R., 2005. Molecular identification of plankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquat. Microbial. Ecol.* 39: 145-157.
- Fuhrman, J.A., Azam, F., 1982. Thymidine incorporation as a measure of heterotrophic bacterioplankton production in marine surface waters: evaluation and field results. *Mar. Biol.* 66:109-20.
- Francoeur, S.N., Wetzel, R.G., 2003. Regulation of periphytic leucine-aminopeptidase activity. *Aquat. Microbial. Ecol.* 31: 249-258.
- Gattuso, J.P., Frankignoulle, M., Wollast, R., 1998. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 29: 405-434.
- Gauch, H.C., 1982. Multivariate analysis in community ecology. Cambridge University Press, pp 307.
- Giovannoni, S.J., DeLong, E.R., Olsen, G.J., Pace, N.R., 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *Jour. Bacteriol.* 170: 720-726.
- Glockner, F.O., Fuchs, B.M., Amann, R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3721-3726.
- Glockner, F.O., Zaichikov, E., Belkova, N., Denisova, L., Pernthaler, J., Pernthaler, A., Amann, R., 2000. Comparative 16S rRNA Analysis of Lake Bacterioplankton Reveals Globally Distributed Phylogenetic Clusters Including an Abundant Group of Actinobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11): 5053-5065.

- Goldman, J.C., Caron, D.A., Dennett, M.R., 1987. Regulation of gross growth efficiency in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnol. Oceanogr.* 32(6): 1239-1252.
- Gonzalez, J.M., Moran, M.A., 1997. Numerical Dominance of a Group of Marine Bacteria in the α -Subclass of the Class Proteobacteria in Coastal Seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(11): 4237-4242.
- Hagstrom, A., Azam, A., Andersson, A., Wikner, J., Rassoulzadegan, F., 1988. Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49: 171-178.
- Hamasaki, K., Long, R.A., Azam, F., 2004. Individual cell growth of marine bacteria, measured by bromodeoxyuridine incorporation. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 35: 217-227.
- Hamilton, W.A., Charaklis, W.G., 1989. In structure and function of biofilms. ed. W. G. Charaklis and P. A. Wildrer. John Wiley, New York.
- Head, I.M., Saunders, J.R., Pickup, R.W., 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35, 1-21.
- Hedges, J.I., 1992. Global biogeochemical cycles: progress and problems. *Mar. Chem.* 39: 63-96.
- Holmfeldt, K., Dziallas, C., Titelman, J., Pohlmann, K., Grossart, H.P., Riemann, L., 2009. Diversity and abundance of freshwater Actinobacteria along environmental gradients in the brackish northern Baltic Sea. *Environ. Microbiol.* 11(8): 2042-2054.
- Huang, C.T., McFeters, G.A., Stewart, P., 1996. Evaluation of physiological staining. Cryoembedding and autofluorescence quenching techniques on fouling biofilms. *Biofouling* 9: 269-277.
- Jefferson, K.K., Goldmann, D.A., Pier, G.B., 2005. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(6): 2467-73.
- Kaeberlein, T., Lewis, K., Epstein, S.S., 2002. Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, 296: 1127-1129.
- Keil, R.G., Kirchman, D.L. 1993. Dissolved combined amino acids in marine waters: chemical form and utilization by heterotrophic bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1256-1270.
- Kirchman, D.L., 2002. The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39: 91-100.

Kirchman, D.L., Yu, L., Cottrell, M.T., 2003. Diversity and abundance of uncultured Cytophaga-like bacteria in the Delaware estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(11): 6587-6596.

Kirchman, D. L., Dittel, A. I., Malmstrom, R. R., Cottrell, M. T., 2005. Biogeography of Major Bacterial Groups in the Delaware Estuary. *Limnol. and Ocean.*(50) 5: 697-1706.

Kirschner, A.K.T., Velimirov, B., 1999. Benthic bacterial secondary production measured via simultaneous ³H-Thymidine and ¹⁴C-Leucine incorporation, and its implication for the Carbon Cycle of a shallow macrophyte-dominated Backwater System. *Limnol. and Ocean.* 44, No. 8: 1871-1881.

Krstulovic, N., Solic, M., Marasovic, I., 1998. Regulation of bacterial abundance along the trophic gradient in the central Adriatic. *Rapp. Comm. int. Mer. Medit.* 35: 352-353.

Langenheder, S., Kisand, V., Wikner, J., Tranvik, L.J., 2003. Salinity as a structuring factor for the composition and performance of bacterioplankton degrading riverine DOC. *FEMS Microbiol. Ecol.* (45): 189-202.

Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Muyzer, G., Bernard, L., Schafer, H., Pukall, R., Stackebrandt, E., Guindulain, T., Vives-Rego, J., (2001). Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosm: changes in abundance, activity and composition. *FEMS Microbil. Ecol.*, 34, 255-266.

Legovic, T., Zutic, V., Grzetic, Z., Cauwet, G., Precali, R., Vilicic, D., 1994. Wutrophication in the Krkaa estuary. *Mar Chem* 46: 1-2, 203-215.

Leriche, V., Briandet, R., Carpentier, B., 2003. Ecolgy of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline effect of one species another. *Environ. Microbiol.* 10: 1462-2920.

Leucena, F., Bosch, A., Ripoll, J., Jofre, J., 1988. Fecal pollution in Llobregat river: interrelationships of viral, bacterial, and physic-chemical parameters. *Water, Air, and Soil Pollution* 39: 15-25.

Little, C., 2000. The biology of soft shores and estuaries. Oxford: Oxford University Press.

Llobet-Brossa, E., Rossello-Mora, R., Amann, R., 1998. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2691-2696.

Lock, M.A., 1993. Attached microbial communities in rivers. p. 113-138. In T. E. Ford (ed.) *Aquatic Microbiology an Ecological approach*. Blackwell Scientific Pubblication, Oxford, United Kingdom.

- Lopez-Archilla, A.I., Gerard, E., Moreira, D., Lopez-Garcia, P., 2004. Macrofilamentous microbial communities in the metal-rich and acidic River Tinto, Spain. *FEMS Microbiology Letters* 235: 221-228.
- Loy, A., Beisker, W., Meier, H., 2005. Diversity of bacteria growing in natural mineral water after bottling. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3624-3632.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukuma *et al.*, 2004. ARB: a software environment for sequences data. *Nucleic Acid Res.* 32: 1363-1371.
- Mac Donald, R., Broè Zel, V.S., 2000. Community analysis of bacterial biofilma in a simulated recalcitrating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rna-targeted oligonucleotide probes. *Water Research.* 34: 2439-2446.
- Mantoura, R.F.C., Martin, J.M., Wollast, R., 1991. *Ocean Margin Processes in Global Change*, Chichester, UK: Wiley and Sons, 469pp.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K. H., 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides in the natural environment. *Microbiology (UK)* 142: 1097-1106. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 229: 43-59.
- Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R., 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb. Ecol.* 37 : 225-237.
- McCarthy, M.D., Hedges, J.I., Benner, R., 1998. Major bacterial contribution to marine dissolved organic nitrogen. *Science* 281 (5374), 231-234.
- Meng Pang, C., Liu, W.T., 2006. Biological filtration limits carbon availability and affects downstream biofilm formation and community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* p. 5702-5712.
- Moran, M.A., Zepp, R.G., 1997. Role of photoreactions in the formation of biologically labile compounds from dissolved organic matter. *Limnol. Oceanogr.* 42 (6): 1307-1316.
- Moratò, J., Codiny, F., Mas, J., 2004. Microscopy techniques applied for monitoring the development of aquatic biofilms. *Current issues on multidisciplinary microscopy researches and education.* p. 93-100.
- Morris, R.M., Rappe, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L., Siebold, W.A., Carlson, C.A., Giovannoni, S.J., 2002. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities, *Nature* 420: 806-810.
- Morton, L.H.G., Greenway, D.L.A., Gaylarde, C.C., Surman, S.B., 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilm to biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation.* Vol. 41. Issues 3-4., p. 247-259.

- Munoz, I., Lopez-Doval, J., Ricart, M., Villagrassa, M., Brix, M., Geislinger, A., 1987. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat River basin (NE Spain). *Environ. Toxicol. Chem.* 10/08-486.1.
- Murray, A.G., Eldridge, P.M., 1998. Marine viral ecology: incorporation of bacteriophage into the microbial planktonic food web paradigm. *Plankton Res.* 16(6): 627-641.
- Murrell, M., 2003. Bacterioplankton dynamic in a subtropical estuary: evidence for substrate limitation. *Aquat. Microb. Ecol.* 32: 250.
- Nagata, T., Kirchman, D.L., 1999. Bacterial mortality: A pathway for the formation of refractory DOM? M. Brylinsky, C. Bell, P. Johnson-Green eds.: *New frontiers in microbial ecology: Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecol.* Atlantic Canada Society for Microbial Ecology. 153-158.
- Nagata, T., 2000. Production mechanisms of dissolved organic matter. *Microbial Ecology of the oceans*. New York: Wiley-Liss, Inc, 121-152.
- Nicholas, W.W., 1994. Biofilm permeability to antibacterial agents. In *bacterial biofilms and their control medicine and industry*. ed. J. Wimpenny, W. W. Nicholas, D. Stickler and H. Lappin-Scott, pp. 141-149. British Biofilms Club, Inaugural Meeting held at Gregynog Hall, Wales. BioLine, Cardiff.
- Nielsen, R., Andreas, J., Palmgren, R., 1997. Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Water Science and Technology*. Volume 36, Issue 1, 11-19.
- Nishimura, Y., Nagata, T., 2007. Alpha-Proteobacterial dominance in a large mesotrophic lake (Lake Biwa, Japan). *Aquat. Microbial. Ecol.* 48:231-240.
- O'Sullivan, L.A., Weightman, A.J., Fry, J.C., 2001. New degenerate Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides-Specific 16S ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probes reveal high bacterial diversity in river Taff epilithon. *Appl. Environ. Microbiol.* 201-210.
- Olsen, G.J., Lane, D.J., Giovannoni, S.J., Pace, N.R., Stahl, D.A., 1986. Microbial ecology and evolution: a ribosomal approach. *Annu. Rev. Microbiol.* 40: 337-365.
- Percent, S.F., Frischer, M.E., Vescio, P.A., Duffy, E.B., Milano, V., McLellan, M., Stevens, B. M., Boylen, C.W., Nierzwicki-Bauer, S., 2008. Bacterial Community Structure of Acid-Impacted Lakes: What Controls Diversity?. *Appl. Environ. Microbiol.* 74 (6): 1856-1868.
- Pernetta, J.C., Milliman, J.D., 1995. Land-ocean interactions in the costal zone. *Implementation plan. IGBP Rep.* 33: 1- 215.

- Pernthaler, J., Glockner, F.O., Schonhuber, W., Amann, R., 2001. Fluorescence in situ hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Methods in Microbiol., Mar. Microbiol.* 30: 207-226.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R., 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3094-3101.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., 2005. Diurnal variation of cell proliferation in three bacterial taxa from coastal north sea waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4638-4644.
- Pettine, M., Casentini, B., Fazi, S., Giovanardi, F., Pagnotta, R., 2007. A revisitation of TRIX for trophic status assessment in the light of the European Water Framework Directive: Application to Italian coastal waters. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1413–1426.
- Piccin, C., Conde, D., Alonso, C., Sommaruga, R., Pernthaler, J., 2006. Blooms of Single Bacterial Species in a Coastal Lagoon of the Southwestern Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 6560-6568.
- Pinhassi, J., Hangstrom, Å., 2000. Seasonal succession in marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 21: 245-256.
- Pinhassi, J., Berman, T., 2003. Differential Growth Response of Colony-Forming and Proteobacteria in Dilution Culture and Nutrient Addition Experiments from Lake Kinneret (Israel), the Eastern Mediterranean Sea, and the Gulf of Eilat. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1): 199-211.
- Pizzetti, I., Fuchs, B.M., Gerds, G., Wichels, A., Wiltshire, K.H., Amann, R., 2011. Temporal Variability of Coastal Planctomycetes Clades at Kabeltonne Station, North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5009-5017
- Pomeroy, L.R., 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience.* 24: 499-504.
- Pommier, T., Canback, B., Riemann, I L., Bostrom, K.H., Simu, K., Lundberg, P., Tuldin, A., Hagastrom, Å., 2007. Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton. *Molecular Ecology.* 16: 867-880.
- Porter, K.G., Feig, Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, 25: 943-948.
- Posh, T., Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Nedoma, J., Sattler, B., Psnner, R., 1999. Predator-induced changes of bacterial size-structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquat. Microb. Ecol.* 18: 235-246.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acid Res.* 35: 7188-7196.

- Puddu, A., La Ferla, R., Allegra, A., Bacci, C., Lopez, M., Oliva, F., Pienotti, C., 1998. Seasonal and spatial distribution of bacterial production and biomass along a salinity gradient (Northern Adriatic Sea). *Hydrobiol.*, 363: 271-282.
- Puddu, A., Zoppini, A., 2005. La circolazione del carbonio e della biomassa nei sistemi acquatici: il ruolo delle comunità microbiche. *Il monitoraggio Ambientale II*.
- Pusch, M., Fiebig, D., Brettar, I., Eisenmann, H., Ellis, B.K., Kaplan, L.A., 1998, The role of micro-organism in the ecological connectivity of running waters. *Freshwat. Biol.* 40:453-495
- Rappe, M.S., Vergin, K., Giovannoni, S.J., 2000. Phylogenetic comparisons of a coastal bacterioplankton community with its counterparts in open ocean and freshwater systems. *FEMS Microbiology Ecology*. 33: 219-232.
- Raven, J.A. and Falkowski, 1999. Oceanic sinks for atmospheric CO₂. *Plant Cell and Environ. Microbiol.* 67 (1), 387-395.
- Ravenschlag, K., Sahm, K., Amann, R.I., 2001. Quantitative molecular analysis of the microbial community in marine arctic sediments (Svalbard). *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 387-395.
- Redfield, J.L., Ketchum, B.H., Rickards, F.A., 1963. The influence of organisms on the composition of seawater. In: Hill MN (ed) *The sea*. John Wiley & Sons, New York. 26-77.
- Relman, D.A., 1993. The identification of uncultured microbial pathogens. *Jour. Infect. Dis.* 168: 1-8.
- Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2000. Dynamics of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 578-587.
- Riemann, L., Leitet, C., Pommier, T., Simu, K., Holmfeldt, K., Larsson, U., Hagstrom, A., 2008. The Native Bacterioplankton Community in the Central Baltic Sea Is Influenced by Freshwater Bacterial Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(2): 503-515.
- Rier, S.T., Stevenson, R.J., 2001. Relation of environmental factors to density of epilithic lotic bacteria in 2 ecoregions. *Jour. North Am. Benthol. Soc.* 20: 520-532.
- Robinson, C., Williams, P.I., 2005. Respiration and its measurement in surface marine waters. P.A. del Giorgio and P.J.I.B. Williams eds. *Respiration in Aquatic Ecosystem*. Oxford: Oxford University Press, 147-180.
- Rubin, M.A., Leff, G., 2007. Nutrients and other abiotic factors affecting bacterial communities in an Ohio River (USA). *Microbial. Ecol.* 2: 374-383.

- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Ehrlich, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.
- Sander, B.C., Kalff, J., 1993. Factors controlling bacterial production in marine and freshwater sediments. *Microbial. Ecol.* 26: 79-99.
- Schattenhofer, M., Fuchs, B.M., Amann, R., Zubkov, M.V., Pernthaler, J., 2009. Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 11(8): 2078-2093.
- Sekar, R., Fuchs, B.M., Amann, R., Pernthaler, J., 2004. Flow Sorting of Marine Bacterioplankton after Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10): 6210-6219.
- Selje, N., Simon, M., 2003, Composition and dynamics of particle-associated and free-living bacterial communities in the Weser estuary, Germany. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 30: 221-237.
- Selje, N., Simon, M., Brinkhoff, T., 2004. A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate e polar oceans. *Nature*, 427, 445-448.
- Sherr, E.B., Sherr, B.F., 2000. Marine microbes – an overview. In *Microbial Ecology of the Oceans*, Kirchman D.L. Ed., Wiley-Liss.
- Sievert, S., Kuever, J., Muyzer, G., 2000. Identification of 16S Ribosomal DNA-Defined Bacterial Populations at a Shallow Submarine Hydrothermal Vent near Milos Island (Greece). *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7): 3102-3109.
- Simek, K., Hornak, K., Masin, M., Christaki, U., Nedoma, J., Weinbauer, M., Dolan, J., 2003. Comparing the effects of resource enrichment and grazing on a bacterioplankton community of a meso-eutrophic reservoir. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 31: 123-135.
- Simonato, F., Gomez-Pereira, P.R., Fuchs, B.M., Amann, R., 2010. Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:128-138.
- Simon, M., Glockner, F.O., Amann, R., 1999. Different community structure and temperature optima of heterotrophic picoplankton in various regions of the Southern Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 18: 275-284.
- Simon, M., Grossart, H., Schweitzer, B., Plough, H., 2002. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystem. *Aquat. Microb. Ecol. Rev.* 28: 175-211.
- Stepanauskas, R., Moran, M.A., Brian, A., Bergamaschi, B.A., Hollibaugh, J.T., 2003. Covariance of bacterioplankton composition and environmental variables in a temperate delta system. *Aquat. Microb. Ecol.* 31: 85-98.

- Steven, B., Briggs, G., McKay, C.P., Pollard, W.H., Greer, C.W., Whyte, L.G., 2007. Characterization of the microbial diversity in a permafrost sample From the Canadian high Arctic using culture-dependent and culture-independent methods. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59: 513-523.
- Sunamura, M., Maruyama, A., 2006. A digital imaging procedure for seven-probe-labeling FISH (Rainbow-FISH) and its application to estuarine microbial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.* 55: 159-166.
- Suttle, C.A., 2005. Viruses in the sea. *Nature* 437 (7057), 356-361.
- Tanoue, E., Nishiyama, S., Kamo, M., Tsugita, A., 1995. Bacterial membranes: possible source of a major dissolved protein in seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59 (12), 2643-2648.
- Teira, E., Gasol, J.M., Aranguren-Gassis, M., Fernández, A., González, J., Lekunberri, I., Álvarez-Salgado, X.A., 2008. Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem. *Environ. Microbiol.* 10(4): 906–917.
- Tien, M., Geib, S.M., Jimenez-Gasco, M.M., Carlson, J.E., 2009. Microbial community profiling to investigate transmission of bacterial between the stages of the wood-boring beetle. *Microbiol. Ecol.* 58: 199-211.
- Tlili, A., Berard, A., Roulier, J.L., Volat, B., Montuelle, B., 2010, PO₄³⁻ dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquat. Toxil.* 98(2): 165-177,
- Torsvik, V., Yvreaas, L., 2002. Microbial diversity and function in soils: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Troussellier, M., Schafer, H., Batallier, N., Bernard, L., Couries, C., Lebaron, P., Muyzer, G., Servais, P., Vives-Rego, J., 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône River plume, France). *Aquat. Microb. Ecol.* 28: 13-24.
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., Ohwada, K., 1999. Microbial diversity in marine sediments from Sagami Bay and Tokyo Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene analysis. *Microbiology* 145: 3305-3315.
- Wagner, M., Horn, H., Daims, H., 2003. Fluorescence in situ hybridization for the identification and characterization of prokaryotes. *Curr. Opin. In Microbiol.* 6: 302-309.
- Wagner, M., 2004. Deciphering functions of uncultured microorganisms. *ASM News* 70: 63-70.
- Warkentin, M., Freese, H.M., Schumann, R., 2011. Bacterial activity and Bacterioplankton Diversity in the Eutrophic River Warnow. Direct measurement of

bacterial growth efficiency and its effects on carbon utilization. *Environ. Microbiol.* 61:190-200.

Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R., Hofer, J.S., Pernthaler, J., 2005. Abundances, Identity, and Growth State of Actinobacteria in Mountain Lakes of Different UV Transparency. *Appl. Environ. Microb.* 71(9): 5551-5559.

Webster, N.S., Smith, L.D., Heyward, A.J., Watts, J.E.M., Webb, R.I., Blackall, L.L., Negri, A.P., 2004. Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1213-1221.

Weiss, P., Schweitzer, B., Amann, R., Simon, M., 1996. Identification in situ and dynamics on limnetic organic aggregates (lake snow). *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1998-2005.

Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.C., 1999. Microbial Extracellular polymeric substances: characterization, structures and function. Springer-Verlag, Berlin, Chapter.

Williams, N., 1998. The Mediterranean beckons to Europe's oceanographers. *Science* 279: 483-484.

Woese, C.R., 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.

Zhang, Y., Jiao, N.Z., Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2006. Contribution of major bacterial group to bacterial biomass production along a salinity gradient in the South China Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 43 (3): 233-241.

Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316-322.

Zwart, G., Kamst-van Agterveld, M.P., Han, S.K., Crump, B.C., 2002. Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16 rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquat. Microb. Ecol.* 28: 141-155.

Zwart, G., Van Hannen, E.J., Kamst-van Agterveld, M.P., Van der Gucht, K., Lindstrom, E.S., Van Wichelen, J., Lauridsen, T., Crump, B.C., Han, S.K., Declerck, S., 2003. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5875- 5883.

ANNEX I

Pubblicazioni relative alla Tesi di Dottorato

Lupini G., Proia, L., Di Maio, M., Amalfitano, S., Fazi, S., 2011. Combining CARD-FISH and Confocal Laser Scanner Microscopy to assess successional changes of the bacterial community in the freshwater biofilm. *Journal Microbiological Methods*, 86, 248-251.

Proia L., Lupini, G., Osorio, V., Barceló, D., Schwartz, T., Amalfitano, S., Fazi, S., Romaní, A. and Sabater, S. Responses of biofilm bacterial communities to antibiotics in river waters: a translocation study. (Bozza).

Lupini, G., Pizzetti, I., Fuchs, B.M., Amann, R., Fazi, S. Phylogenetic composition of microbial communities in coastal systems with different trophic status (Bozza).

Congressi

Lupini, G., Pizzetti, I., Casella, P., Amalfitano, S., Zoppini, A., Puddu, A., Fazi, S. Struttura e diversità della comunità batterica in acque costiere a differente stato trofico. VIII Incontro dei Dottorandi in Ecologia e Scienze dei Sistemi Acquatici Roma, 27 Febbraio – 1 Marzo 2012.

Lupini, G., Zanobbi, A., Iavarone, E., Amalfitano, S., Fazi, S., Zoppini, A., Puddu, A., 2011. Bacterial activity and biomass production in marine systems characterized by different trophic status. VII Incontro dei dottorandi e post-doc, 11-13 Maggio 2011.

Puddu, A., Amalfitano, S., Casella, P., Di Domenico, A., Fazi, S., Lupini, G., Polesello, S., Zoppini, A., 2011. The activity of sediment bacteria in a temporary river in relation to the hydrological status and to the persistence of organic pollutants. 7TH International SedNet conference 6-9 April 2011, Venice, Italy

Lupini G., Proia, L., Di Maio, M., Amalfitano, S., Romaní, A., Sabater, S., Fazi, S., 2010. Variazioni della struttura della comunità batterica in biofilm fluviali sottoposti a un diverso impatto antropico. XX Congresso SITE 2010 - “Sapienza” Università di Roma, 27 - 30 Settembre 2010.

Zanobbi A., Lupini, G., Casella, P., Amalfitano, S., Zoppini, A., Socal, G., Puddu, A., Fazi, S., 2010. Analisi della composizione filogenetica delle comunità batteriche in aree costiere dell'Adriatico Centrale a diversa trofia. XX Congresso SITE 2010 - "Sapienza" Università di Roma, 27 - 30 Settembre 2010.

Di Maio M., Lupini, G., Proia, L., Amalfitano, S., Fazi, S., 2010. Ottimizzazione delle tecniche di ibridazione in situ (CARD-FISH) per lo studio delle comunità batteriche durante le prime fasi di sviluppo di biofilm acquatici. XX Congresso SITE 2010 - "Sapienza" Università di Roma, 27 - 30 Settembre 2010.

Casella, P., Zoppini, A., Amalfitano, S., Bernardi Aubry, F., Camatti, E., Di Domenico, A., Fazi, S., Lupini, G., Pugnetti, A., Socal, G., Puddu, A., 2010. Importanza delle attività metaboliche del microplankton nel ciclo biogeochimico del carbonio in ambiente marino in diverse condizioni di trofia. XX Congresso SITE 2010 - "Sapienza" Università di Roma, 27 - 30 Settembre 2010.

Di Domenico, A., Zoppini, A., Casella, P., Lupini, G., Amalfitano, S., Fazi, S., Patrolecco, L., Ademollo, N., Capri, S., Puddu, A., 2010. Interazione tra idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e respirazione mediata dalle comunità microbiche dei sedimenti di fiumi temporanei. XX Congresso SITE 2010 - "Sapienza" Università di Roma, 27 - 30 Settembre 2010.

Proia, L., Osorio, V., Lupini, G., Soley, S., Di Maio, M., Barceló, D., Fazi, S., Perez, S., Romaní, A., Sabater, S., 2010. Microbial biofilm response to translocation along a pollution gradient in a highly impacted river. Summer meeting with ASLO and MABS, June 6th-11th 2010, Santa Fe (New Mexico - USA).

Lupini, G., Zanobbi, A., Amalfitano, S., Fazi, S., Zoppini, A., Puddu, A., 2010. Composizione filogenetica delle comunità batteriche in sistemi costieri a diversa trofia. VI Incontro dei dottorandi e post-doc "Analisi dei Sistemi Acquatici ed Ecologia", A.I.O.L. - S.It.E. Ancona 24 - 26 Febbraio 2010.

Olivetti, F., Pizzetti, I., Lupini, G., Amalfitano, S., Fazi, S., Fuchs, B., Amann, R., 2009. Abbondanza e diversità dei *Planctomycetes* in ambienti lagunari e costieri (Sabaudia - Lazio). XIX Congresso S.It.E. - Bolzano, 15 - 18 Settembre 2009.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth


Note

CARD–FISH and confocal laser scanner microscopy to assess successional changes of the bacterial community in freshwater biofilms

Giuliano Lupini ^a, Lorenzo Proia ^b, Mariarita Di Maio ^a, Stefano Amalfitano ^a, Stefano Fazi ^{a,*}
^a Water Research Institute, IRSA-CNR, via Salaria km 29.300, 00015 Monterotondo, Roma, Italy

^b Institute of Aquatic Ecology, University of Girona, Campus Montilivi, 17071, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2011

Accepted 15 May 2011

Available online 19 May 2011

Keywords:

Biofilm

Bacterial community composition

CARD–FISH

CLSM

Stream ecology

ABSTRACT

Bacterial community composition was assessed during riverine biofilm development by the Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence In Situ Hybridization (CARD–FISH) in combination with Confocal Laser Scanning Microscopy. Using artificial substrates, it was possible to follow the dynamics of specific bacterial clusters, while maintaining the unaltered structure and architecture of the biofilm.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

In riverine systems, the majority of bacteria are associated in biofilms, forming complex communities with an intricate architectural organization and contributing substantially to nutrient cycling (Lock, 1993; Fazi et al., 2005; Battin et al., 2008) and streams functioning (Battin et al., 2003). Recently, successions of microbial communities have received increasing attention (Fierer et al., 2010), and biofilms could become a relevant ecological model to study the successional changes in bacterial communities. Biofilm development is characterized by biomass increments in the earlier stages and changes in the three-dimensional structure during maturation (Watnick and Kolter, 2000; Neu et al., 2010). By fluorescent nucleic acid staining techniques, it is possible to assess the structural and spatial distribution of prokaryotes in biofilms (Müller et al., 2001; Battin et al., 2003; Besemer et al., 2007) with no information on how specific bacterial clusters contribute to the development of the complex biofilm structures. On the other hand by using fluorescence *in situ* hybridization techniques (e.g. CARD–FISH), the bacterial community composition can be documented, but losing information on the spatial distribution of specific bacterial clusters, which is due to the destruction of the biofilm structure by scraping and filtering (Olapade and Leff, 2005; Fazi et al., 2007; Braun et al., 2009).

When it comes to the possibility of visualizing specific cells while maintaining unaltered the 3D structure of the biofilm, there

have been substantial improvements made by utilizing FISH in combination with Confocal Laser Scanning Microscopy (see CLSM–FISH in Amann et al., 1998). A limited number of studies have demonstrated the direct use of CLSM–FISH on a biofilm attached to an artificial or natural substratum (e.g. polycarbonate slides – Manz et al., 1999; clay beads – Gieseke et al., 2003; polystyrene beads – Delatolla et al., 2009; marine algae – Tujula et al., 2006). Several attempts have recently been made by embedding biofilms on gel pads (Daims and Wagner, 2007) or by using crio-sectioning (Flood and Ashbolt, 1998; Ito et al., 2002; Matsumoto et al., 2007; Shiraishi et al., 2008). However, such additional manipulation can potentially lead to a loss of mass and/or distortion of the *in situ* perspective (Delatolla et al., 2009). Herein, we optimized a straightforward CARD–FISH protocol in combination with CLSM for the hybridization and the inspection of riverine biofilms attached to the original substrate. Thus, the protocol allows the simultaneous identification and the spatial localization of cells, while maintaining unaltered the natural architecture of the biofilm.

An experimental mesocosm was set up with stream water (100 l), sediments (4 kg) and biofilm-colonized stones collected from the Rio Moscio Stream (Latium, Italy). Water flow was maintained by a peristaltic pump, and the water was aerated by an air-pump. After an one-month acclimatization period, glass slides were placed into the mesocosm. Due to the impracticality of applying the CARD–FISH protocol to the biofilm grown on flat microscope glass slides, traditionally used for the analysis of the epiphytic community in flowing water systems (Lock, 1993), we utilized chambered slides (10-well diagnostic microscope epoxy

* Corresponding author at: Water Research Institute, IRSA-CNR, Via Salaria km 29.300, CP10, 00015 Monterotondo, Roma, Italy.

E-mail address: fazi@irsa.cnr.it (S. Fazi).

coated slides; well diameter: 6.7 mm – Thermo Scientific, Germany). The slides were randomly collected in triplicate on day 5, 20 and 40 and then fixed in formaline (2% final concentration). The slide surfaces around the wells were gently cleaned with a small tampon to remove the biofilm which had grown in-between the wells, thus avoiding buffer scramble during the procedure. CARD-FISH was performed optimising the protocol for the analysis of bacterial cells on polycarbonate membrane after sample filtration described by Fazi et al. (2005, 2008). Pre-warmed 0.2% low melting point ultrapure agarose (Invitrogen Life Technologies, California) was pipetted into the wells to avoid cell detachment. The wells of the chambered slides enabled us to work with drops of buffers (20 μ l) and to create an optimal micro-environment for the permeabilization (buffers: 20 mg ml⁻¹ lysozyme and 0.034 U μ l⁻¹ proteinase K), hybridization (buffer: 50 ng μ l⁻¹ oligonucleotidic probes) and signal amplification (2.5 μ g ml⁻¹ fluorescein-labelled tyramide) (Sigma-Aldrich, Germany) phases of the CARD FISH protocol, keeping the sample hydrated during all the incubations (see Fig. 1 in Supplementary material). Slides were incubated in a humidified 50 ml tubes and all the washing steps were done dipping the entire slides in 50 ml of washing solutions and buffers. We used horseradish peroxidase (HRP) labeled oligonucleotidic probes (Biomers, Germany) to target *Bacteria* (Eub I–III), *Alpha-proteobacteria* (ALF968), *Beta-proteobacteria* (BET42a) and *Gamma-proteobacteria* (GAM42a) (Loy et al., 2007). Hybridized cells were quantified by both Epifluorescence Microscopy (EM) and Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM).

The percentage of bacterial hybridized cells (EUB I–III probes) showed an average value of $65.2 \pm 5.7\%$, in line with data reported for scraped and filtered biofilm samples (Brümmer et al., 2000; Olapade and Leff, 2005; Fazi et al., 2005; Braun et al., 2009), thus excluding that the biofilm thickness and the extracellular polymeric matrix could either restrict the accessibility of probes or attenuate the fluorescence signal (Barranguet et al., 2004).

Moreover, we did not find any significant difference when comparing the abundance of bacterial cells among the 10 wells on a single slide (one-way ANOVA, $P=0.21$), thus revealing that well location on slides had no effect on biofilm development. Similar results were obtained for *Alpha*- *Beta*- and *Gamma-proteobacteria* abundances among wells on a single slide (one-way ANOVA, $0.14 < P < 0.93$).

Biofilm thickness ranged between 4 μ m and 7 μ m after five days of immersion, while at day 20 compact and stable biofilms were already visible, with thickness values ranging between 10 μ m and 12 μ m. The highest thickness value (19 μ m) was recorded at the end of the experiment (day 40) and, as expected, the variability in thickness increased with biofilm maturation (Fig. 1a). Specific cell counting by EM highlighted similar cell abundances for *Alpha*-, *Beta*- and *Gamma-proteobacteria* after five days of colonization. During biofilm development (day 20), cell abundances gradually increased, with the highest values observed for *Beta-proteobacteria*. At day 40, *Alpha-proteobacteria* became the dominant component of the biofilm community, in accordance with previous observations (Manz et al., 1999; Dang and Lovell, 2000; Webster et al., 2004). *Gamma-proteobacteria* increased more gradually, meanwhile, the abundance of *Beta-proteobacteria* remained similar to the previous sampling. Similar patterns were revealed by CLSM image analysis by considering the percentage of the biofilm area covered by hybridized cells (Fig. 1b–c). Moreover, the three-dimensional reconstruction of CLSM images allowed to precisely locate specific bacterial cells within the biofilm structure (Fig. 2 and Fig. 2 in Supplementary material). Overall, we demonstrated that bacterial successional changes can be described by applying the CARD-FISH protocol to intact biofilms, which are ultimately from rivers, thereby avoiding biofilm detachment or manipula-

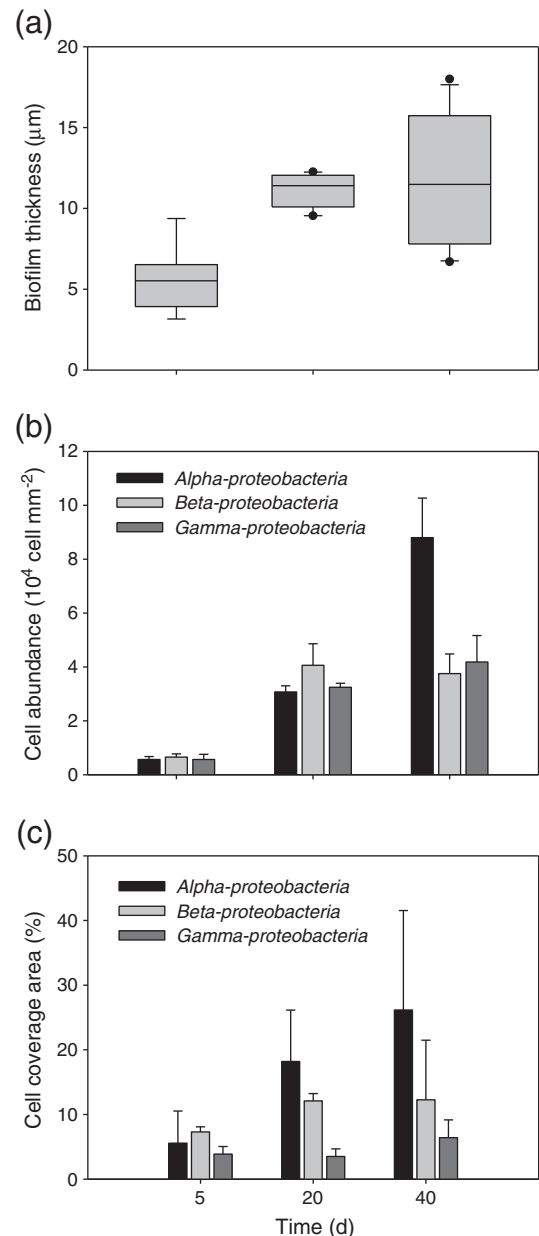


Fig. 1. (a) Box-plot of biofilm thickness that was evaluated as the distance between the lowest and the highest image showing a fluorescent signal, captured by CLSM (Leica TSC-SP2, Germany). The pinhole diameter was adjusted so that each image represented an optical section of the biofilm thickness every 0.167 μ m. (b) Abundance of hybridized cells quantified by EM (Leica DM LB 30, Germany), adjusting the focal plane downwards to the biofilm depth. (c) Percentage of the total area occupied by hybridized cells over the total biofilm area. At least three RGB confocal image stacks were captured for each well and analysed by the software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

tions. Our approach, in combination with an appropriate spatial analysis, could contribute to elucidate how specific bacterial clusters participate to the development of the complex biofilm structures and the mechanisms that regulate community composition dynamic and cell dispersion in aquatic environments.

Acknowledgments

We thank F. Fazi for the use of the CLSM and valuable support.

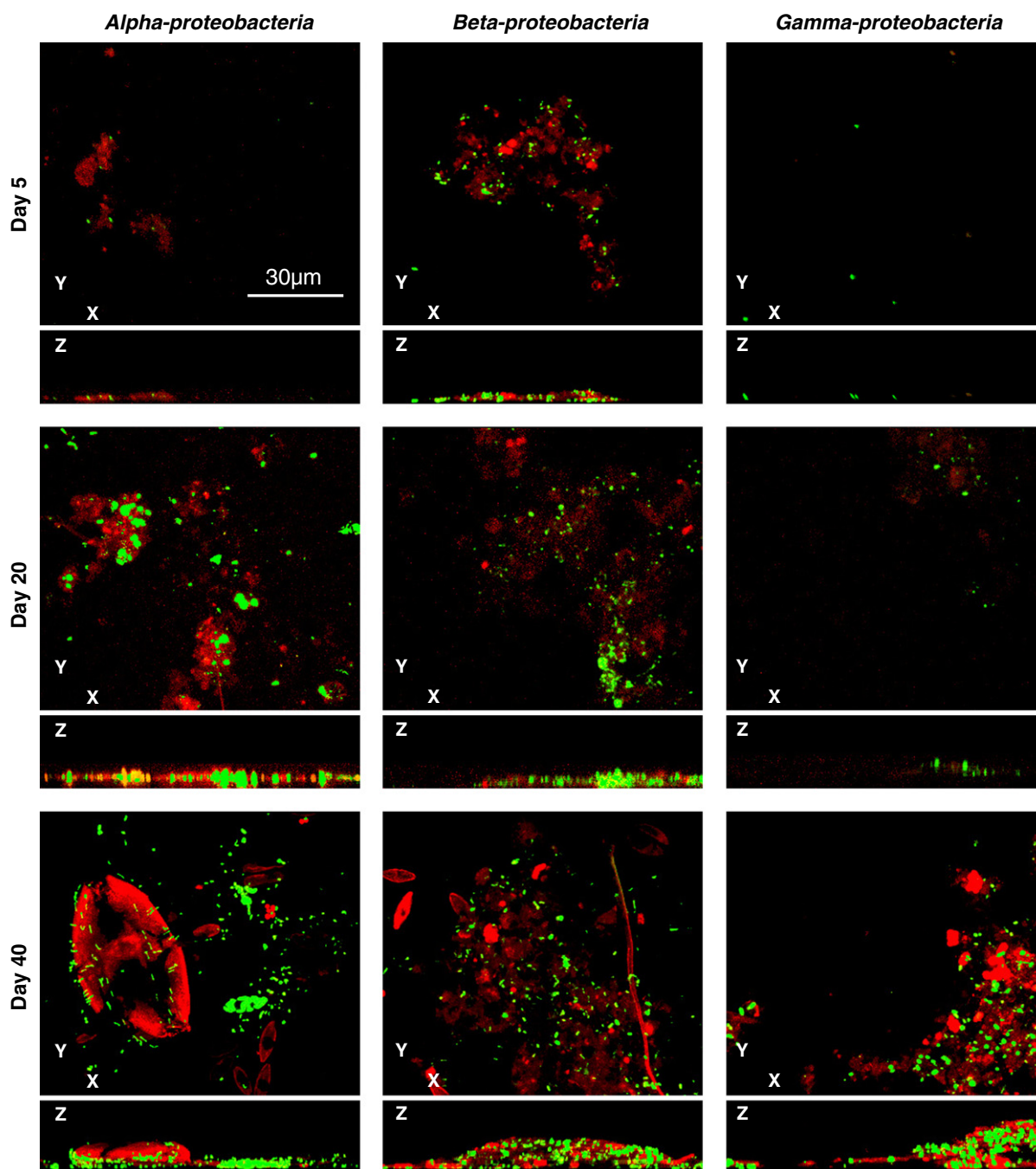


Fig. 2. CLSM combined images showing the spatial distribution of the *Alpha*-, *Beta*- and *Gamma*-proteobacteria (X-Y and X-Z planes) during a 40 day incubation period as determined by CARD-FISH. The auto fluorescence of the photosynthetic pigments was detected with the 633-nm line of an Ar/HeNe laser (excitation) and observed in the red and far-red channels at 590 to 800 nm (emission). The hybridized cells were excited with the 488-nm line of an Ar laser and observed in the green channel from 490 to 530 nm. Scale bar refers to all panels.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at [doi:10.1016/j.mimet.2011.05.011](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.05.011).

References

- Amann, R., Lemmer, H., Wagner, M., 1998. Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25, 205–215.
- Barranguet, C., Van Beusekom, S., Veuger, B., Neu, T., Manders, E., Sinke, J., et al., 2004. Studying undisturbed autotrophic biofilms: still a technique challenge. *Aquat. Microb. Ecol.* 34, 1–9.

- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Newbold, J.D., Cheng, X., Hansen, C., 2003. Effects of current velocity on the nascent architecture of stream microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5443–5452.
- Battin, T.J., Kaplan, L.A., Findlay, S., Hopkinson, C.S., Marti, E., Packman, A.I., et al., 2008. Biophysical controls on organic carbon fluxes in fluvial networks. *Nat. Rev. Microbiol.* 1, 96–100.
- Besemer, K., Singer, G., Limberger, R., Chlup, A.K., Hochedlinger, G., Hodl, I., et al., 2007. Biophysical controls on community succession in stream biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4966–4974.
- Braun, B., Richert, I., Szewzyk, U., 2009. Detection of iron-depositing *Pedomicrobium* species in native biofilms from the Odertal National Park by a new, specific FISH probe. *J. Microbiol. Methods* 79, 37–43.
- Brümmer, I.H.M., Fehr, W., Wagner-Dobler, I., 2000. Biofilm community structure in polluted rivers: abundance of dominant phylogenetic groups over a complete annual cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3078–3082.

- Daims, H., Wagner, M., 2007. Quantification of uncultured microorganisms by fluorescence microscopy and digital image analysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 237–248.
- Dang, H., Lovell, C.R., 2000. Bacterial primary colonization and early succession on surfaces in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 467–475.
- Delatolla, R., Tufenkji, N., Comeau, Y., Lamarre, D., Gadbois, A., Berk, D., 2009. In situ characterization of nitrifying biofilm: minimizing biomass loss and preserving perspective. *Water Res.* 43, 1775–1787.
- Fazi, S., Amalfitano, S., Pernthaler, J., Puddu, A., 2005. Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environ. Microbiol.* 7 (10), 1633–1640.
- Fazi, S., Amalfitano, S., Pizzetti, I., Pernthaler, J., 2007. Efficiency of fluorescence in situ hybridization for the identification of bacterial cells in river sediments with contrasting water content. *Syst. Appl. Microbiol.* 30, 463–470.
- Fazi, S., Amalfitano, S., Piccini, C., Zoppini, A., Puddu, A., Pernthaler, J., 2008. Colonization of the overlying water by bacteria from dry river sediments. *Environ. Microbiol.* 10, 2760–2772.
- Fierer, N., Nemergut, D., Knight, R., Craine, J.M., 2010. Changes through time: integrating microorganisms into the study of succession. *Res. Microbiol.* 161, 635–642.
- Flood, J.A., Ashbolt, N.J., 1998. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Nat. Rev. Microbiol.* 209, 734–736.
- Gieseke, A., Bjerrum, L., Wagner, M., Amann, R., 2003. Structure and activity of multiple nitrifying bacterial populations co-existing in a biofilm. *Environ. Microbiol.* 5, 355–369.
- Ito, T., Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y., 2002. Successional development of sulfate-reducing bacterial populations and their activities in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1392–1402.
- Lock, M.A., 1993. In: Ford, T.E. (Ed.), *Attached microbial communities in rivers*. : Aquat. Microb. Blackwell, Cambridge, MA, pp. 113–138.
- Loy, A., Maixner, F., Wagner, M., Horn, M., 2007. ProbeBase – an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes: new features 2007. *Nucleic Acids Res.* 35, 800–804.
- Manz, W., Wendt-Potthoff, K., Neu, T.R., Szewzyk, U., Lawrence, J.R., 1999. Phylogenetic composition, spatial structure, and dynamics of lotic bacterial biofilms investigated by fluorescent in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Microb. Ecol.* 37, 225–237.
- Matsumoto, S., Terada, A., Aoi, Y., Tsuneda, S., Alpkvist, E., Picioreanu, C., et al., 2007. Experimental and simulation analysis of community structure of nitrifying bacteria in a membrane-aerated biofilm. *Water Sci. Technol.* 55, 283–290.
- Müller, E., Drewello, U., Drewello, R., Weißmann, R., Wuertz, S., 2001. In situ analysis of biofilms on historic window glass using confocal laser scanning microscopy. *J. Cult. Herit.* 2, 31–42.
- Neu, T.R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J.J., Hitchcock, A.P., Lawrence, J.R., 2010. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiol. Ecol.* 72, 1–21.
- Olapade, O.A., Leff, L.G., 2005. Seasonal response of stream biofilm communities to dissolved organic matter and nutrient enrichments. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2278–2287.
- Shiraishi, F., Zippel, B., Neu, T.R., Arp, G., 2008. In situ detection of bacteria in calcified biofilms using FISH and CARD-FISH. *J. Microbiol. Methods* 75, 103–108.
- Tujula, N.A., Holmström, C., Mußmann, M., Amann, R., Kjelleberg, S., Crocetti, G.R., 2006. A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae. *J. Microbiol. Methods* 65, 604–607.
- Watnick, P., Kolter, R., 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* 182, 2675–2679.
- Webster, N.S., Smith, L.D., Heyward, A.J., Watts, J.E.M., Webb, R.I., Blackall, L.L., et al., 2004. Metamorphosis of a scleractinian coral in response to microbial biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1213–1221.

Supplementary material

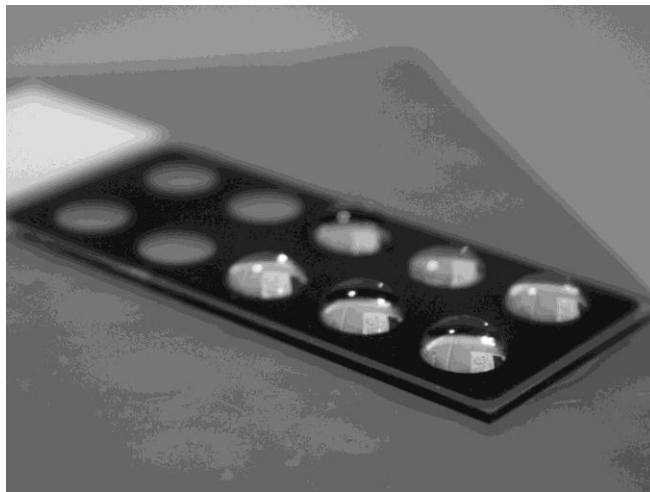


Figure 1. CARD-FISH hybridization buffer placed on diagnostic microscope epoxy coated slides (10 wells with 6.7 mm diameter). The slides were directly utilized as an artificial substrate for the biofilm growth.

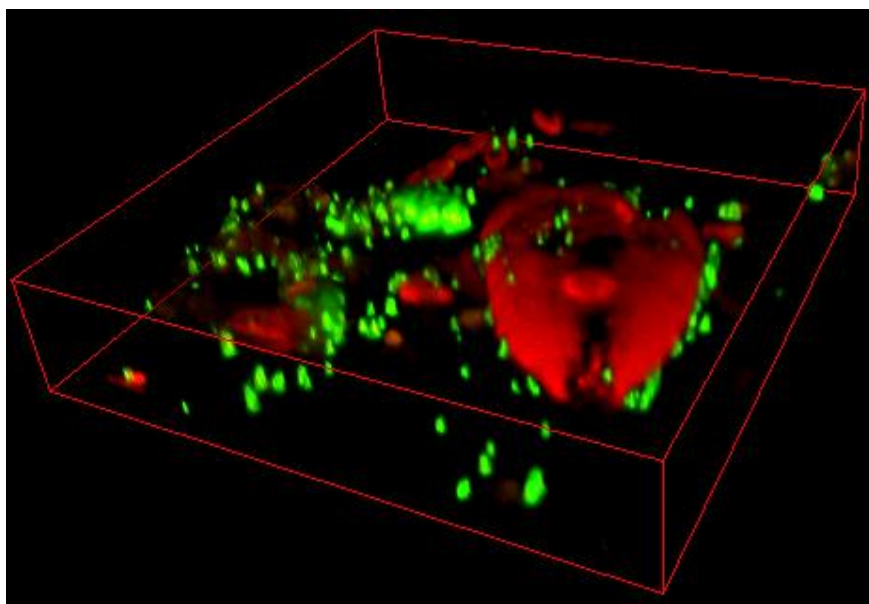


Figure 2. 3D image reconstruction showing the spatial distribution of *Alpha-proteobacteria* hybridized cells (green) and algae (red) in a 40 days biofilm.

Dynamics of bacterioplankton community in the Northern Adriatic Sea detected by CARD-FISH and 16S rRNA Gene Clone Libraries.

Lupini G.¹, I. Pizzetti^{1,2}, B.M. Fuchs², A. Puddu¹, R. Amann², S. Fazi¹

¹ Water Research Institute, IRSA-CNR, via Salaria km 29.300, 00015 Monterotondo, Roma, Italy

² Max Planck Institute for Marine Microbiology (MPI), Celsiusstrasse 1, D-28359 Bremen, Germany

Keywords: Bacterial Community Composition, CARD-FISH, 16S rRNA Clone Library

*Corresponding Author

Stefano Fazi

Water Research Institute, IRSA-CNR

Via Salaria km 29.300 - CP10

00015 Monterotondo - Roma, Italy

fazi@irsa.cnr.it

Abstract

In this study 16S rRNA approach was used to investigate the bacterial diversity and community composition along a trophic and salinity gradient in the Northern Adriatic Sea in March 2009 and November 2009. Samples were collected from the water column along a coastal-offshore transect at different depths corresponding to PAR (*Photosynthetically active radiation*).

Comparative sequences analysis of 230 clones, partial length 16S rDNA gene sequences, indicate an high diversity and the dominance of *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Cytophaga-Flavobacterium*. Many of these sequences were close to the 16S rDNA marine, often coastal bacterioplankton such as SAR11 and class of *Flavobacteriales*.

Furthermore composition of bacterioplankton was quantified by *Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence in situ Hybridization* (CARD-FISH) with a set of rRNA oligonucleotide probes. CARD-FISH counts showed a relation between the bacterial community and chemical-physical parameters. *Alphaproteobacteria* group typical of marine environment, was favoured by the low concentrations of nutrients; *Cytophaga-Flavobacterium* group was related to higher POC concentration in coastal samples. Interestingly, the high presence of *Actinobacteria* bacterial group typically of freshwater environment in coastal water, showed a strongly and significant salinity gradient in Adriatic Sea.

Introduction

In marine and coastal environments heterotrophic bacteria play an important role in organic matter remineralisation utilizing the large amount of dissolved organic matter (Martinez et al., 1996; Pinhassi et al., 1997; Muylaert et al., 2002). So far numerous studies focused on bulk-community dynamic, closely related to environmental characteristics, water masses stratification and the water column trophic status (Ettuomi et al., 2010; Bagwell et al., 2009; Kolber et al., 2001). Thanks to the development of *in situ* molecular tools, it is now possible to follow the dynamic of specific bacterial groups in order to better understand the role of the microbial community in the ecosystemic processes (Alonso-Saez et al., 2007; Brown et al., 2005; Ghiglione et al., 2005; Schauer et al., 2003) and to elucidate the role of freshwater-seawater interaction on cell survival and dispersion. Relatively few studies have assessed seasonal bacterial diversity in coastal-marine environments, applying different molecular approaches (Schauer et al., 2003; Brown et al., 2005; Ghiglione et al., 2005).

Heterotrophic bacteria are recognized to be the major decomposers of organic matter (Fenchel et al., 1979; Wetzel, 1982) and to have a key role in marine biogeochemical cycles in ecosystem structure where efficient recycling processes are crucial (Cho & Azam, 1990; Azam and Worden, 2004; Castle and Kirchman, 2004).

Studies addressing the analysis of trophic state of coastal environments have been mostly focused on inorganic nutrient concentrations (mainly, N and P), phytoplankton community analysis (structure, primary production, growth rates) or alteration of chemical and physical parameters (e.g., turbidity, oxygen concentration; Justic, 1990; Zurlini, 1996). Environmental conditions and gradients, such as salinity, could change the relation on the bacterial utilization of available organic sources, with important implications for food web dynamics, carbon flow and nutrient cycling (Biddanda et al., 2001) and could be factor of

marked changes in the bacterial community composition in the carbon cycling (Giuliano et al., 1998; Selje et al., 2003; Crump et al., 2004; Kirchman et al., 2005; Teira et al., 2008) where the estuary typically hosts a mixture for the marine and freshwater bacterial communities (Crump et al., 1999; Troussellier et al., 2002).

Del Giorgio and Bouvier (2002) and Painchaud et al. (1995) showed that salinity selectively affected some bacterial groups, which responded to changing salinity with a marked decrease in cell-activity, abundance and growth. These disturbance factors might act a filter on bacterial communities, resulting in loss for some species and activation for others (Gerdes et al., 1985; Rodrigues-Valera, 1988; Casamayor et al., 2002; Jungblut et al., 2005; Rothrock et al., 2005).

Bacterioplankton dynamics are governed by seasonal changes in abiotic and biotic factors, especially phytoplankton dynamics in the coastal marine environments; the rapid growth and changes in the aquatic bacterial community suggest that the production of heterotrophic bacterial biomass represent an important link between dissolved organic matter and higher trophic level (Pomeroy, 1974; Ducklow et al., 1986), especially in the marine coastal-offshore transect (Azam et al., 1983; Acinas et al., 1997; Murray et al., 1998; Schauer et al., 2000; Ghiglione et al., 2005; Pernthaler & Amann, 2005).

Major changes in the organic matter concentration and composition are expected to occur at different stages of the bloom. The variations in the organic matter regime during the natural bloom of phytoplankton are typically accompanied by pronounced changes in the bacterial abundance and productivity (Middelboe et al., 1995; Riemann et al., 2000; Fandino et al., 2001; Arrieta et al., 2002; Pinhassi et al., 2004; Rooney-Varga et al., 2005). Rooney and colleagues (2003) emphasized differences in the quality of organic matter produced by different types of phytoplankton cause shift in the species composition of bacterial community utilizing this organic matter. Recently results of experimental studies have suggested that top-down factors could also regulate bacterial populations (Pomeroy et al., 2001).

In the Adriatic Sea some authors have already described bacterial dynamic (Turk et al., 2001; Paoli et al., 2006) and the phylogenetic diversity of bacteria but, without considering the temporal variations of the trophic state within the basin.

The study of microbial communities in highly dynamic coastal environments could help to elucidate which environmental characteristics mainly affect community composition dynamic (Shiemi). The Adriatic Sea is characterized by different trophic conditions, a productive (potentially eutrophic) shallow northern basin and an oligotrophic in the central and southern basin. The northern region is characterized by marked seasonal and long-term fluctuations of oceanographic and biological conditions, mainly due to atmospheric forcing, freshwater discharges (Degobbi and Gilmartin, 1990; Revelante and Gilmartin, 1976, 1992; Zavatarelli et al., 1998), variable intrusion of high salinity waters, and complex circulation pattern (Franco 1982; Orlic' et al. 1992; Poulain et al. 2001; Russo et al. 2005). These characteristics are principally due to the river runoff in the northern area, represented by the Po River, that causes an increase in nutrient enrichment and primary production in this area. Nutrient supply to the euphotic zone strongly depends on the vertical stratification/mixing processes (Zavattelli et al., 2000). The middle and southern regions of the Adriatic Sea are characterized by a lower primary productivity, with open waters oligotrophic characteristics (Vilicic et al., 1989). Puddu et al., (1998) in studies conducted on Adriatic Sea found that the bacterial abundances were lower respect to the other estuarine areas, contrasting with the general understanding that the estuarine ecosystem, in consequence of the input of both allochthonous organic matter and autochthonous production, are characterized by high bacterial numbers (Heip et al., 1995). Puddu and colleagues (1998) reported, in the occurrence of different trophic conditions, results that show how bacterioplankton production in the Northern Adriatic is extremely high near the coast in low salinity, high nutrient waters. Adriatic Sea is a semienclosed ecosystem that receives in its shallow part, northern basin, significant freshwater inputs which markedly increase its productivity in contrast to with respect to the oligotrophic features of the Mediterranean Sea (Puddu et al., 1998). Riverine inputs are mainly due to the Po river that accounts for 51% of the total freshwater flow into the Northern Adriatic (Degobbi & Gilmartin, 1990). The Adriatic circulation is mostly driven by strong thermoaline forces, caused by the freshwater input, producing a flow of less dense surface waters and more dense subsurface waters southeasterly directed along the Italian coast (Artegiani et al., 1996).

During the last decade, bacterial populations have been described in details showing how they are distributed in time and space in the

environments (Schauer et al., 2003). Inputs from Po river enhance salinity stratification, modify circulation and water exchange patterns between the northern and central basins, and contribute to high spatial and temporal variability of nutrients and phytoplankton biomass (Degobbi et al., 2000). P concentrations are extremely low and could play an important role as limiting nutrient (Vukadin and Stojanoski 1976; Zore-Armanda et al. 1991). Due to anthropogenic influence in coastal areas (Baric' et al. 1996; Legovic' et al. 1994) nutrients increase occur leading to a trophic gradient from the coastal area to the open sea towards (Krstulovic' et al. 1997). Our principal aims was to determine how the trophic state of the water column affects the phylogenetic diversity and dynamics of the bacterial assemblages in Adriatic Sea. In particular, we try to elucidated the driving forces for shift in bacterial community structure over the transect coast-offshore in the different trophic state in the marine-coastal ecosystem. It was hypothesized that salinity as well phytoplankton dynamics account for the shift in the bacterial community composition. (Amann et al., 1995; Cottrell et al., 2000; Giovannoni et al., 2000; Holmfeldt et al., 2009; Simonato et al., 2010). Bacterial diversity was determined by comparative sequences analysis of several 16S rRNA gene clone libraries. Furthermore the quantitative microbial community composition was investigated by *Catalyzed Reporter Deposition* (CARD-FISH) (Pernthaler et al., 2002, Alonso-Saez et al., 2007).

Material and methods

Study site and sampling

Two sampling cruises were carried out in March and November 2009 in the North Adriatic Sea. Water samples (5L) were collected using a Niskin bottle at different depths in according to the *in situ* measured of the % of *Photosynthetically active radiation* (PAR) from four stations (S1-S4) along a coastal-off shore transect (Fig.1); Fourteen and fifteen samples were collected in March and November, respectively. S1 (coastal station, 43° 44' N, 13° 23' E) was located 11 km from the coast, S2 (43° 48' N, 13° 31' E), S3, (43° 56' 98' N, 13° 49' E) and S4 (off-shore station, 44° 01' N, 13° 59' E) were respectively located 24, 51 and 68 km apart from coast.

Environmental parameters as temperature, salinity, pH, dissolved oxygen and PAR were determined by Idronaut probe. Particulate organic carbon (POC) and dissolved organic carbon (DOC) as well as dissolved nutrients (phosphate, nitrate and nitrite) were measured.

For DNA analysis, surface and bottom samples (1L) from S1 and S4 stations were collected in duplicate and they were filtered directly onto 0.2 µm pore-size polycarbonate membrane filter (47 mm diameter, GE Water and Process Technologies, USA). Filter were immediately frozen and kept at -20 °C until the extraction. For CARD-FISH aliquots of 25 mL were collected and were fixed with formaldehyde (2% final concentration) for 2 hours at room temperature. Samples were filtered onto 0.2 µm pore-size polycarbonate membrane filter (GE Water and Process Technologies, USA) and stored to -20°C.

DNA isolation and PCR amplification

Total nucleic acids were extracted from the 0.2 µm filters and isolated according to the protocol of Zhou and colleagues (Zhou et al., 1996) and slightly modified by Pizzetti and co-workers (Pizzetti et al. 2011). Only a modification was carried out: centrifugation steps were performed at 14,000 x g.

Nearly complete 16S rRNA genes were amplified using the general bacterial primers GM3 (5'-AGAGTTTGATCMTGGC-3'), and GM4 (5'-TACCTGTGTTACGACTT-3') (Muyzer et al., 1993).

Each PCR mixture with a volume of 50 µl contained 0.3 mg ml⁻¹ bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemie, Taufkirchen, Germany), 1x reaction buffer (TaKaRa Bio Inc., Japan), 0.25 mM each deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.5 µM each primer (Biomers, Ulm, Germany), 0.02 U µl⁻¹ *Taq* polymerase (TaKaRa Bio Inc., Japan) (all concentrations are final concentrations) and 1 µl of DNA. The amplification was performed with a Thermocycler (Perkin-Elmer AmpGen 2400) as follows: denaturation step at 94°C for 5 min followed by 25 cycles of 1 min denaturation at 94°C, annealing at 48°C for 1 min, elongation at 72°C for 1 min and final elongation at 72°C for 10 min. PCR products were determined with 1% agarose gel electrophoresis (Biozym LE agarose; Biozym, Oldendorf, Germany).

Fragments excised from a 1.5% agarose gel were then extracted and purified by QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, Hilden, Germany) prior to cloning in TOPO TA Cloning KIT (Invitrogen, Gröningen, Netherlands), according to manufacturers' instructions. The recombinant

vectors were transformed into chemically competent *E.coli* cells TOPO One Shot Mach1-T1 by thermal shock, plated and picked.

Clone inserts were amplified by PCR using vector primers M13F (F stands for forward) (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') and M13R (R stands for reverse) (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). The reaction conditions were: denaturation step at 94°C for 5 min followed by 30 cycles of 1 min denaturation at 94°C, annealing at 57°C for 1.30 min, elongation at 72°C for 3 min and final elongation at 72°C for 15 min. All the PCR products were purified by using the *mi*-PCR Purification Kit (Metabion, Germany).

Sequencing reactions were performed using the 907 RM primer (5'-CCGTCGAATTCMTTGTGAGTTT-3') to obtain partial sequences with an average length of 700 bp.

All sequences were checked by free-downloading software FinchTV, aligned by Silva database (Pruesse et al., 2007) and phylogenetic analyses were performed by ARB software package (www.arb-home.de; Ludwig et al., 2004). For in depth phylogenetic analysis, only sequences with >1200 nucleotides were included. The phylogenetic reconstruction tree was based on distance matrix (e.g. neighbour-joining) and the maximum likelihood methods with 50% positional conservatory filters for group of *Alpha*-, *Gamma*-proteobacteria, *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* (*Cytophaga-Flavobacteria*). The *Betaproteobacteria*, *Firmicutes* and *Spirochetes* were used as out-group.

CARD-FISH

CARD-FISH was performed according to the protocols described by Pernthaler and colleagues (2002, 2004). Filter sections were embedded in 0.2% (wt/vol) agarose (Invitrogen Life Technologies) for 10 min to avoid cell detachment. Filters were permeabilized with lysozyme (20 mg ml⁻¹, Fluka, Steinheim, Germany; buffer contained 0.5 M EDTA [pH 8] and 1 M Tris-HCl [pH 7.4]) for 1 h at 37 °C followed by proteinase K (0.034 U µl⁻¹ - SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany, in 0.5 Tris-EDTA [pH 7.4] buffer for 25 minutes at 37 °C.

Horseradish peroxidase (HRP) labeled oligonucleotide probes (Biomers, Germany) were used to target *Bacteria* (Eub I-III), *Actinobacteria* (HGC69a), *Alpha*-proteobacteria (ALF968), *Cytophaga-Flavobacteria* (CF319a) and *Gamma*-proteobacteria (GAM42a). In order to specifically target the *Gamma*-proteobacteria general probe, GAM42a, was used with a competitor according to Manz and colleagues (1992). Probes (50 ng µl⁻¹) were added to the hybridization buffer (5M NaCl, 1M Tris/HCl - pH 7.4, 10% w/v dextran sulfate, 0.02% w/v sodium dodecyl sulphate, 10% w/v blocking reagent - Roche Diagnostic GmbH, Germany) containing the following concentration of formamide: 20% v/v for *Alpha*-proteobacteria, 55% v/v for *Bacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* and *Gamma*-proteobacteria and 30% v/v for *Actinobacteria*.

The hybridized and washed filter sections were subsequently embedded in a mounting mixture containing 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, USA) at a final concentration of 1 µg ml⁻¹. DAPI stained and probe hybridized cells were observed and quantified by epifluorescence microscopy (EM) (Leica DM LB 30, at 1000X magnification).

After hybridization, the samples were placed in 50 ml of pre-warmed washing buffer (5M NaCl, 1M Tris/HCl [pH 7.4], 0.5M EDTA [pH 8], 0.01% w/v sodium dodecyl sulphate in ultrapure water) at 48°C for five minutes. After washing, filters were placed in an amplification buffer (2 µl fluorescein-labelled tyramide - SIGMA-ALDRICH, Germany - in 30% H₂O₂, PBS [pH 7.4], 5M NaCl, 10% w/v blocking reagent, 10% w/v dextran sulphate) and incubated at 37°C for 10 minutes in the dark. Then filters were washed in PBS solution at room temperature in the dark for 25 minutes and counterstained with 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Laboratories, USA) at a final concentration of 1 µg ml⁻¹. DAPI stained and probe hybridized cells were observed and quantified by epifluorescence microscopy (EM) (Leica DM LB 30, at 1000X magnification).

Statistical analysis

Multivariate analyses and Spearman rank correlations were performed with the software PAST (Palaeontological Statistics, ver. 2.01) [<http://folk.uio.no>].

Results

Physico-chemicals parameters

In March with salinity ranging between 34.0 (S1) to 38.4 (S4). Water temperature ranged from 10.5 °C (S1) to 12.0 °C (S4). Concentration of POC showed values from 104.4 µg l⁻¹ (S1) to 70.3 µg l⁻¹ (S4) and DOC concentration ranged from 1.496 mg l⁻¹ (S1) to 1.687 mg l⁻¹ (S4).

Nutrients, concentration were measured and showed decreasing values for N from the coastal (S1) to the off-shore stations (S4) (14.7 μM and 0.94 μM respectively) and an increasing value for P from 0.02 μM to 0.05 μM along the transect coast-offshore. Chlorophyll *a* showed values between 0.53 $\mu\text{g l}^{-1}$ in S1 and 0.42 $\mu\text{g l}^{-1}$ in S4.

In November the coastal station (S1) is well differentiated by the other stations, with lower salinity (36.0) and higher temperature (15.0 $^{\circ}\text{C}$) than March. Water column for other stations shows a homogeneity with a salinity average value of 38.5. Water column for station S4 was characterized by a stratification around 35-45m as indicated by a step gradient in temperature (17.0 $^{\circ}\text{C}$ surface; 13.5 $^{\circ}\text{C}$ bottom). DOC concentration decreased from 1.261 mg l^{-1} to 0.943 mg l^{-1} from S1 to S4, and POC showed values ranged from 161.4 $\mu\text{g l}^{-1}$ (S1) to 47.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ (S4). Nitrate concentration showed values ranging from 6.57 μM in S1 to 1.38 μM in S4; for phosphate, were measured concentrations ranged from 0.18 μM to 0.38 μM in S1 and S4 respectively. Chlorophyll *a* in coastal station (S1) was higher than March with maximum value of 1.15 $\mu\text{g l}^{-1}$; in S4 were registered low concentrations (around 0.28 $\mu\text{g l}^{-1}$). The nutrients measurements revealed a different trophic state in March and in November; TRIX index was calculated and described, in March, an oligotrophic state for the water; meanwhile for November index described a mesotrophic state characterized by higher concentrations for P and Chl *a*.

Bacterioplankton diversity and composition

Total bacterioplankton abundance, as determined by DAPI counting, in March ranged value from 1.89×10^6 cell ml^{-1} (S1) to 6.19×10^5 cell ml^{-1} (S4); in November the total bacterial abundance increased with value, of 2.60×10^6 cell ml^{-1} S1 and in S4 with 6.24×10^5 cell ml^{-1} (Fig.2).

BAB was correlated with concentration of total POC, POC considered alloctonous and chlorophyll concentration. These correlation show an increasing bacterial abundance linked to the higher concentration of the particle organic carbon (total and derived) and the higher concentration of Chl *a* (Fig. 3).

Cells detected by the universal probes for *Bacteria* (EUB I-III) ranging between 8.13×10^5 (March) and 1.15×10^6 (November). CARD-FISH counts with group specific probes showed the dominance of *Alpha-proteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria* (group of *Bacteroidetes*) and *Gamma-proteobacteria*. Furthermore, CARD-FISH showed that the group of *Actinobacteria* was a minor component of bacterial community in the samples of Adriatic Sea (Fig.4).

Alpha-proteobacteria as detected by the CARD-FISH, in March, represented the dominant bacterial group with increasing values along the transect with, average value of DAPI stained cells, ranging from 7.65×10^5 cell ml^{-1} (S1), to 3.08×10^5 cell ml^{-1} in off-shore station. Same situation in November where values ranged between 1.32×10^6 cell ml^{-1} and 3.17×10^4 cell ml^{-1} in coastal and off-shore stations respectively.

The abundance of the bacterial group *Cytophaga-Flavobacteria* in March ranged from a higher abundance in coastal sample with average value of 2.75×10^5 cell ml^{-1} to 5.56×10^4 cell ml^{-1} in the off-shore samples; in November the total abundance for this group was higher than March with values ranged from 1.05×10^6 cell ml^{-1} in coastal station to 1.23×10^5 cell ml^{-1} in off-shore station. Otherwise both samples were characterized by an higher percentage in the surface than depth, and a strong gradient coast-off shore.

CARD-FISH detected in March, for the group of *Gamma-proteobacteria*, a maximum abundance in coastal station with average value of 2.71×10^5 cell ml^{-1} and a lower abundance in off-shore sample with 8.13×10^4 cell ml^{-1} . In November was observed a lower abundance if compared to March; abundance ranged from 1.50×10^5 cell ml^{-1} (S1) to minimum abundance value in off-shore station with value of 6.18×10^3 cell ml^{-1} (S4). Many of the clones affiliated to the phylogenetic group of *Gamma*- were found in the coastal samples; particularly in the surface library. Furthermore for the group of *Gamma-proteobacteria*, respect to other groups, there was not discrepancy between the frequencies found for clones and the CARD-FISH counts.

Group of *Actinobacteria*, detected by the HGC69a probe, ranged from 1.21×10^5 cell ml^{-1} in coastal station (S1) to 1.19×10^4 cell ml^{-1} in the off-shore station for the total bacterioplankton for March samples.

November showed some differences for the bacterial group abundance, with decreasing values especially for off-shore station (S4); in coastal station abundance was observed and abundance similar to March sample with a value of 1.42×10^5 cell ml^{-1} , meanwhile in off-shore station (S4) abundance value was 1.28×10^3 cell ml^{-1} . These data confirm an higher abundances of these bacteria in the coastal samples, with decreasing abundance along the coast-offshore transect.

Four 16S rDNA libraries were constructed from water samples with a general bacterial primer set. We analysed 230 sequences, with samples from surface (S1) and depth (S4) in March and November.

Overall the four libraries were dominated by four bacterial group; *Alpha-proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Gamma-proteobacteria* and *Actinobacteria*. These groups ought to be expected in marine surface water (Glöckner *et al.*, 1999; Schattenhofeer *et al.*, 2009) except for the sequences affiliated to *Actinobacteria* group retrieved from freshwater, to indicate the freshwater input. Sequences for the groups of *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Beta-proteobacteria*, typical for marine bacterioplankton libraries, were not abundant in the four clone libraries. The frequencies of sequences affiliated with *Alpha-proteobacteria* were higher in the library of November than in March. Differences in the libraries were observed. In March, sequences were more abundant in the sample collected in coastal station (surface); in November, off-shore station (S4, depth -65) showed a major abundance of sequences respect to the coastal sample. In addition, most of the alphaproteo-bacterial sequences (46% of the total *Alpha-proteobacteria* group) in all four libraries were clustered with the order of *Rhodobacterales*; 40% of total *Alpha-proteobacteria* sequences were affiliated to genus SAR11, typical marine organism. Furthermore, related to the *Rhodobacterales* order were retrieved 13% of sequences affiliated to genus *Takeymaria* and *Loktanella* respectively. Besides, few sequences clustered with *Rhodospirillales* order (13%) were retrieved from the water column. *Bacteroidetes* (*Cytophaga-Flavobacterium*) represent the 13% of the total sequences of bacterial cells. The majority of the sequences were found in the libraries in the coastal sample (surface and depth) during March sampling. Many sequences retrieved were affiliated to the class *Flavobacteriales*, clade NS5 marine group (50%) and NS4 marine group (6%). Some sequences were related to genus *Cryomorphocea* (20%), *Fluvicola* (6%) and *Crocinitomix* (13%). *Gamma-proteobacteria* sequences in the libraries dominated with 19% of the total sequences. Most of the sequences obtained from the water samples were affiliated to *Alteromonadales* (47%) and related to genus SAR92 (19%). Sequences clustered with order *Pseudomonadales* (13%) were all affiliated with genus *Psychrobacter*. Several sequences affiliated to SAR86 belonged to *Oceanospirillales* (22%) clade. In the clone library *Actinobacteria* was the second abundant group (15% of the total bacterial cells) and sequences were much more abundant in the coastal station characterized by low salinity. Most of these sequences were clustered with order *Micrococcales*, *Microbacteriaceae*, typical of estuarine habitat (88% of the total sequences of *Actinobacteria* affiliated with genus *Candidatus Aquiluna*), and with uncultured *Acidimicrobiaceae* (11%).

Environmental parameters and community structure

To examine the relationships between microbial community structure and environmental factors, we conducted a principal analysis component (PCA) (Gauch, 1982; Legendre *et al.*, 2001) in order to reduce the amount of studied variables to a few components explaining most of the observed variability. PCA was performed using the most significant environmental parameters and the bacterial community abundance (Fig.5).

The two first principal components in March explained 75% of the variability in the original data. The first principal component, which explained for 57% of the variability, described an environment characterized for the coastal samples by high inorganic nutrients concentrations (NO_3) and POC concentration and low salinity, temperature and PO_4 concentration. Groups of *Gamma-proteobacteria* e *Actinobacteria* are strongly associated with coastal samples and are negatively correlated with salinity ($r = -0.84$ and $r = -0.86$, $P < 0.05$) and temperature ($r = -0.81$ and $r = -0.83$, $P < 0.05$) while group of *Cytophaga-Flavobacteria* is positively correlated with POC ($r = 0.85$, $P < 0.05$).

Station S2 and S4, were associated to salinity, temperature, DOC and PO_4 . In this two stations the group of *Alpha-proteobacteria*, dominated the bacterial assemblage.

In November the two first principal components explained 84% of the variability in the original data. The first component (66%) described such as in March an environment characterized, for the coastal samples, by high inorganic nutrients concentrations (NO_3), high dissolved and POC concentration and low salinity, temperature and PO_4 . The specific groups of *Actinobacteria*, *Gamma-proteobacteria* and CF, associated to the coastal station, were negatively correlated with salinity and temperature ($r = -0.92$, -0.88 , -0.94 , $P < 0.05$) and associated to high concentration of POC and NO_3 .

Station S2, S3 and S4, were strongly associated to salinity, temperature, and PO₄.

Discussion

In the past, although different approaches have been used, including genome hybridization (Pinhassi & Hagstrom, 2000) and FISH most studies were relied on PCR-techniques (Schauer et al., 2003; Ghiglione et al., 2005, which may not provide a reliable quantification of the abundance of groups of microbial community. The objective of our study was to provide a vision of the seasonality of bacterial assemblages in coastal-off shore transect in relation to the trophic state, combining different molecular approaches. We used clone library method associated to CARD-FISH to analyze the bacterial community composition. Clone library technique could be associated with possible biases introduced by PCR. Despite these problems, PCR - approaches have provided valuable information which allow us to compare communities in different environments characterized by salinity gradient. The use of a PCR – independent method (i.e. CARD-FISH) allowed the identification and quantification of the dominant bacterial groups by the use of specific probes. These complementary approaches have been compared and, in our study, have not revealed strong differences in the bacterial assemblages.

CARD-FISH results show average value for *Bacteria* cluster of 80% of the total bacterial cells. The detection rate of EUB338 in this study, on marine environments, was higher but comparable with other studies (Glöckner et al., 1999; Dang et al., 2001; Alonzo-Saez et al., 2006; Cottrell et al., 2000; Simonato et al., 2010). Failure to detect some cells by this molecular technique could be attributed to incomplete detection of *Bacteria* as mentioned from Daims et colleagues (1999) and to the fact that not all bacteria in natural system are detectable. However other factors could contribute to failure of detection of some bacterial cells, including poor penetration of the probes (Amann et al., 1995).

Comparing this quantitative technique with the qualitative clone library we not found strong differences relatives to the abundance of the principal bacterial groups. Our sequencing analysis of clones showed bacterial communities composed of typical marine population of *Proteobacteria*, *Bacteroides* and *Actinobacteria*. Data obtained from our libraries are confirmed from the studies of Celussi and colleagues (2007), in the northern Adriatic Sea.

Alpha-proteobacteria was the dominant group in CARD-FISH and in clone libraries samples. There was a marked seasonality in the *Alpha-proteobacteria* group with similar presence in coastal and offshore (March and November) samples in agreement with the results of Morris et al., (2002, 2005) from the Atlantic Ocean. Our data have been confirmed by works of Kirchman et al., (2005) that described this group in estuary environments with increasing salinity and trophic gradient. Furthermore the presence of this group seems also to be related to nutrients-rich concentration in oligo-mesotrophic waters as in Adriatic Sea (Riemann et al., 2000; Pinhassi & Berman, 2003; Fuchs et al., 2004; Percent et al., 2008).

The major percentage of clones are related to SAR11 cluster, in agreement with previous studies that suggest that SAR11 could be the most abundant bacterial group in the ocean (Giovannoni et al., 2000; Morris et al., 2002). The cluster SAR11 in our samples was found in higher percentage than in other coastal sample (Rappè et al., 1997, 2000) and similar to open waters in Mediterranean Sea as described in the works of Acinas et al., (1999) that found a 35% of clones related to this group. The dominance of *Alpha*-and SAR11 results to be a common feature in clone libraries constructed with marine samples as described by Giovannoni and colleagues (2000). In our samples we found an higher abundance by CARD-FISH respect to clone library, disaccording to data obtained from Morris et al., (2002) that observed in the clone library an overestimation explained by different amplification efficiency based on G+C content (Dutton et al., 1993).

Furthermore in our libraries were found sequences related with the group of *Actinobacteria* typical of freshwater environments. These clones were identified only in the surface samples of the coastal sites in both seasons, where the influence of riverine water is stronger than the off-shore sites. Similar data were found in samples analyzed by CARD-FISH. *Actinobacteria* were found in higher average value in the coastal site, and decreased along the transect where the influence of freshwater is lower and salinity increased. Variation of salinity was clearly the major factor responsible for the decreasing presence of *Actinobacteria* along the transect (Holmfeldt et al., 2009; Wu et al., 2006). Our data confirm the study of Simonato and colleagues (2010) in the Adriatic Sea, in which the presence of sequences of *Actinobacteria* could be an indicator of the freshwater input. To confirm the importance of salinity

along the transect, was observed a low relative abundance of clones of *Betaproteobacteria* group in coastal sample. Their decrease presence was linked to increasing salinity (Benlloch et al., 2002; Bouvier et al., 2002; Schauer et al., 2005) and the total absence of this group in the off-shore samples could be due to the limited freshwater influence (Schauer et al., 2003).

These our data contrast the study of Simonato and colleagues (2010) that found many sequences of *Beta*- in the Venice lagoon associated to phytoplankton blooms (Morris et al., 2006) and productive marine coastal ecosystem (Sekar et al., 2004).

Members of *Bacteroidetes* decreased in their abundance between March and November samples.

Particularly a decreasing abundance was observed along the transect from coast to offshore station in relation to peaks of organic matter, chlorophyll a and general availability of nutrients, indicating that members of this group are particularly related to intermediate salinity and high productivity, characteristic often found in coastal environments (Abell et al., 2005; Pommier et al., 2007).

In March, the frequencies of clones affiliated to *Bacteroidetes* were higher than CARD-FISH count; on the contrary in November were observed lower values of clones affiliated, confirming that this group tends to be unrepresented in 16S rRNA gene clone libraries (Cottrell et al., 2000). In relation to these differences between CARD and clone library it is important to mention that the probe used (CF319a) targets mainly the class *Cytophaga-Flavobacteria*, which comprises the most abundant class of planktonic marine *Bacteroides* (Alonso et al., 2007).

Our results show the relative abundance of this group in a strong correlation with the particle organic matter (POC) supporting the hypothesis of the important role that this phylogenetic group is considered to play in the decomposition of recently produced phytoplankton derived-DOM.

References

- Alonso-Saez, L., Balagué, V., Sà, E.L., Sanchez, O., Gonzalez, J.M., Pinhassi, J., Massana, R., Pernthaler, J., Pedros-Alió, C., Gasol, J.M., 2007. Seasonality in bacterial diversity in north-west Mediterranean coastal waters: assessment through clone libraries, fingerprinting and FISH. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60: 98-112.
- Amann, R.L., Ludwig, W., Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Reviews.* 59(1): 143-169
- Arrieta, J.M., Weinbauer, M., Lute, C., Herndl, G.J., (2004). Response of bacterioplankton to iron fertilization in the Southern Ocean. *Limnol Oceanogr.* 49:799-808
- Artefiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F., Russo, A., 1996. The Adriatic SAea General Circulation. Part I: Air-Sea Interactions and Water Mass Structure. *Journ. Of Physical Oceanography*, 27, 1492.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J.G., Gray, J.S., Meyer-Reil, L.A., Thingstad, F., 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263.
- Azam, F., Worden, A.Z., 2004. Microbes, molecules, and marine ecosystem. *Science* 303, 122-1624.
- Bagwell, C.E., Formolo, M., Ye, Q., Yeager, C.M., Lyons, T.W., Zhang, C.L., 2009. Direct analysis of sulfate reducing bacterial communities in gas hydrate-impacted marine sediments by PCR-DGGE. *Journ. Basic Microbiol.* 49: 1-6.
- Baric, A., Gacic, M., Grbec, B., Margeta, J., Milos, B., Onofri, I., Veldic, V., 1996. Implications of expected climatic changes for the Kastela Bay region in Croatia. In: Jeftic, L., Keckes, S., Pernetta, J.C., Climatic change and the Mediterranean 2. Edwards Arnolds, London, pp.143-249.
- Biddanda, B., Ogdahl, M. & Cotner, J. (2001). Dominance of bacterial metabolism in oligotrophic relative to eutrophic waters. *Limnol. Oceanogr.*, 0, 730-739.
- Brown, M.V., Fuhrman, J.A., 2005. Marine bacterial microdiversity as revealed by internal transcribed spacer analysis. *Aquat Microb Ecol.* 41: 15-23.
- Casamayor, E. O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., V. J., Goddard, J. M., Gasol, I., Joint, F., Rodríguez-Valera, C., Pedrós-Alió, 2002. Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ. Microbiol.* 4, 6, 338-348.
- Castle, D., Kirchman, D.L., 2004. Composition of estuarine bacterial communities assessed by denaturing gradient gel electrophoresis and fluorescence in situ hybridization. *Limnol. Oceanogr.* 48, 168-178.

- Celussi, M., Cataletto, B., 2007. Annual dynamics of bacterioplankton assemblages in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Gene* 406: 113-123.
- Cho, B.C., Azam, F., 1990. Biogeochemical significance of bacterial biomass in the ocean's euphotic zone. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 63: 253-259.
- Cottrell, M.T., Kirchman, D.L., 2000. Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(12): 5116-5122.
- Crump, B.C., Armbrust, E.V., Baross, J.A., 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3192-3204.
- Crump, B.C., Kling, G.W., Bahr, M., Hobbie, J.E., 2003. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2253-2268.
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M., 1999. The Domain-specific Probe EUB338 is Insufficient for the Detection of all *Bacteria*: Development and Evaluation of a more Comprehensive Probe Set. *Systematic and Applied Microbiology*, Volume 22, Issue 3, 434-444.
- Dang, H. and Lovell, C.R., 2000. Bacterial primary colonization and early succession in marine waters as determined by amplified rRNA gene restriction analysis and sequence analysis of 16s rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 467-475.
- Degobbi, D., Gilmartin, M., 1990. Nitrogen, phosphorus and biogenic silicon budgets for the northern Adriatic Sea. *Ocean acta* 13, n.1, 31-45.
- Degobbi, D., Precali, R., Ivanic, I., Smodiaka, N., Fuks, D., Kveder, S., 2000. Long-term changes in the northern Adriatic ecosystem related to anthropogenic eutrophication. *Intern Journ. Environ. And Pollut.* 13, n.1-6, 495-533.
- Del Giorgio, P.A., Bouvier, T.C., 2001. Linking the physiologic and phylogenetic successions in free-living bacterial communities along an estuarine salinity gradient. *Limnology and Oceanography*, 47, No. 2, Mar., 2002
- Ducklow, H. W., Purche, D. A., Williams, P. J. LeB., Davies, J.M. (1986). Bacterioplankton: a sink for carbon in a coastal marine plankton community. *Science* 232: 865-867
- Ettoumi, B., Bouhajja, E., Borin, S., Daffonchiob, D., Boudabousa, A., Cherifa, A., 2010. Gamma-Proteobacteria occurrence and microdiversity in Tyrrhenian Sea sediments as revealed by cultivation-dependent and -independent approaches. *Syst. Appl. Microbiol.* 33: 222-231.
- Fandino, L.B., Riemann, L., Steward, G.F., Long, R.A., Azam, F., 2001. Variations in bacterial community structure during a dinoflagellate bloom analyzed by DGGE and 16S rDNA sequencing. *Aquat Microb Ecol.* 23: 119-130.
- Fenchel, T., Blackburn, T. H., (1979). *Bacterial and mineral cycling*. Academic Press, New York
- Franco, P., 1982. *Oceanography of Northern Adriatic Sea. Data from the cruises of the years 1978 and 1979.* *Archivio di Oceanografia e Limnologia*, 20 (1982), pp. 1-207
- Gauch, H.C., 1982. *Multivariate analysis in community ecology*. Cambridge University Press, pp 307.
- Gerdes, G., Krumbein, W.E., Holtkamp, E., 1985. Salinity and water activity related zonation of microbial communities and potential stromatolites of the Gavish Sabkha. In: *Hypersaline Ecosystems; the Gavish Sabkha* (eds G. M.Friedman & W.E.Krumbein). Springer-Verlag, Berlin. *Ecological Studies*, 53, 238-266.
- Ghiglione, J.F., Larcher, M., Lebaron, P., 2005. Spatial and temporal scales of variation in bacterioplankton community structure in the NW Mediterranean Sea. *Aquat Microb Ecol.* 40: 229-240.
- Giuliano, L., De Domenico, M., De Domenico, E., Hofle, M.G., Yakimov, M.M., 1999. Identification of culturale oligotrophic Bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian Sea by 16s rRNA Sequencing and Probing. *Microb. Ecol.* 37: 77-85.
- Glockner, F.O., Fuchs, B.M., Amann, R., 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3721-3726.
- Heip, C.H.R., Goosen, N.K., Herman, P.M.J., Kromkamp, J., Middelburg, J.J., Soetaert, K., 1995. Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews*, 33, pp. 1-150
- Holmfeldt, K., Dziallas, C., Titelman, J., Pohlmann, K., Grossart, H.P., Riemann, L., 2006. Diversity and abundance of freshwater *Actinobacteria* along environmental gradients in the brackish northern Baltic Sea. *Environ. Microbiol.*, 11(8), 2042-2054
- Jungblut, A.D., Hawes, I., Mountfort, D., Hitzfeld, B., Dietrich, D.R., Burns, B.P., and Neilan, B.A. (2005) Diversity within cyanobacterial mat communities in variable salinity meltwater ponds of McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Environ Microbiol* 7: 519-529.
- Kirchman, D. L., Dittel, A. I., Malmstrom, R. R., Cottrell, M. T., 2005. Biogeography of Major Bacterial Groups in the Delaware Estuary. *Limnol. and Ocean.*(50) 5: 697-1706.
- Kolber, Z.S., Plumey, F.G., Andrew, S., Lang, A.S., Beatty, J.T., Blankenship, R.E., Van Dover, C.L., Vetriani, C., Koblizek, M., Rathgeber, C., Falkowski, P.G., 2001. Contribution of aerobic photoheterotrophic bacteria to the carbon cycle in the ocean. *Science* 292: 2492-2495.
- Krstulovic, N., Solic, M., Marasovic, I., 1997. Relationship between bacteria, phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates along the trophic gradient. *Helgolander Meeresunters* 51: 433-443.
- Legović, T., Žutić, V., Gržetić, Z., Cauwet, G., Precali, R., Viličić, D., 1994. Eutrophication in the Krka estuary. *Marine Chemistry*, 46, 1-2, 203-215.
- Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukuma et al., 2004. ARB: a software environment for sequences data. *Nucleic Acid Res.* 32: 1363-1371.
- Martinez, J., Smith, D.C., Steward, G.F., Azam, F., 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat Microb Ecol.* 10: 223-230.
- Middelboe, M., Søndergaard, M., Letarte, Y., Borch, N.H. (1995). Attached and free-living bacteria: production and polymer hydrolysis during a diatom bloom. *Microb Ecol* 29: 231-248
- Murray, A.G., Eldridge, P.M., 1998. Marine viral ecology: incorporation of bacteriophage into the microbial planktonic food web paradigm. *Plankton Res.* 16(6): 627-641.
- Muylaert, K., Van der Gucht, K., Vloemans, N., De Meester, L., Gillis, M., Vyverman, W., 2002. Relationship between Bacterial Community Composition and Bottom-up versus Top-Down Variables in four Eutrophic Shallow Lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: n.10, 4740-4750.
- Orlic, M., Gacic, M., La Violette, P.E., 1992. The currents and circulation of Adriatic Sea. *Oceanol. Acta*, 15, 109-124.
- Painchaud, J., Theriault, J., Legendre, L., 1995. Assessment of salinity-related mortality of freshwater bacteria in the saint lawrence estuary. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: n.1, 205-208.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R., 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol* 68: 3094-3101.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J., 2005. Diurnal variation of cell proliferation in three bacterial taxa from coastal north sea waters. *Appl Environ Microbiol* 71: 4638-4644.
- Pernthaler, J., Amann, R., 2005. Fate of heterotrophic Microbes in pelagic Habitats: focus on populations. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 69, n.3, 440-461.
- Pinhassi, J., Zweifel, U.L., Hangstrom, A., 1997. Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: n.9, 3359-3366.
- Pinhassi, J., et al., 2004. Changes in bacterioplankton composition under different phytoplanktonic regimes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 6753-6766.
- Pizzetti, I., Fuchs, B. M., Gerds, G., Wichels, A., Wiltshire, K.H., Amann R., 2011. Temporal Variability of Coastal Planctomycetes Clades at Kabeltonne Station, North Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5009-5017.
- Pomeroy, L.R., 1974. The ocean's food web, a changing paradigm. *BioScience*. 24: 499-504.
- Pomeroy, L. R., Wiebe, W. J., 2001. Temperature and substrates as interactive limiting factors for marine heterotrophic bacteria. *Aquat Microb Ecol.* 23: 187-204.
- Poulain, P.-M., Mauri, E., Fayos, C., Ursella, L., Zanasca, P., 2001. Mediterranean surface drifter measurements between 1986 and 1999, CD-ROM, Naval Postgraduate School, Monterey, CA, in preparation.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J., Glockner, F.O., 2007. SILVA: a comprehensive online re source for

- quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acid Res.* 35: 7188-7196.
- Puddu, A., La Ferla, R., Allegra, A., Bacci, C., Lopez, M., Oliva, F., Pienotti, C., 1998. Seasonal and spatial distribution of bacterial production and biomass along a salinity gradient (Northern Adriatic Sea). *Hydrobiol.*, 363: 271-282.
- Revelante, N., Gilmartin, M., 1976. The effect of Po River discharge on phytoplankton dynamics in the Northern Adriatic Sea. *Marine Biology*, 34 (1976), pp. 259-271
- Riemann, L., Steward, G.F., Azam, F., 2000. Dynamic of bacterial community composition and activity during a mesocosm diatom bloom. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: n.2, 578-587.
- Rooney-Varga, J.N., Giewat, M.W., Savin, M.C., Sood, S., LeGresley, M., Martin, J.L., 2005. Links between Phytoplankton and Bacterial Community Dynamics in a Coastal Marine Environment. *Microb Ecol* 49, 163-175.
- Rothrock Jr, M. J., Garcia, F., 2005. Microbial diversity of benthic mats along a tidal desiccation gradient. *Environ. Microbiol.*, 7, 4, 593-601.
- Russo, A., Maccaferri, S., Djakovic, T., Precali, R., Degobbis, D., Deserti, M., Paschini, E., Lyons, D.M., 2005. Meteorological and oceanographic conditions in the northern Adriatic Sea during the period June 1999-July 2002: Influence on the mucilage phenomenon. *Science of the Total Environment* 353, 1-3, 24-38.
- Schattenhofer, M., Fuchs, B.M., Amann, R., Zubkov, M.V., Pernthaler, J., 2009. Latitudinal distribution of prokaryotic picoplankton populations in the Atlantic Ocean. *Environ. Microbiol.* 11(8): 2078-2093.
- Schauer, M., Massana, R., Pedrós-Alió, C., (2000) Spatial differences in bacterioplankton composition along the Catalan coast (NW Mediterranean) assessed by molecular fingerprinting. *FEMS Microbiol Ecol* 33: 51-59.
- Schauer, M., Balagué, V., Alió, C.P., Massana, R., 2003. Seasonal changes in the taxonomic composition of bacterioplankton in a coastal oligotrophic system. *Aquat Microb Ecol.* 31: 163-174.
- Sekar, R., Fuchs, B.M., Amann, R., Pernthaler, J., 2004. Flow Sorting of Marine Bacterioplankton after Fluorescence In Situ Hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(10): 6210-6219.
- Selje, N., Simon, M., 2003. Composition and dynamics of particle associated and free-living bacteria communities in the Weser estuary Germany. *Aquat Microb Ecol.* 30: 221-237.
- Simonato, F., Gomez-Pereira, P.R., Fuchs, B.M., Amann, R., 2010. Bacterioplankton diversity and community composition in the Southern Lagoon of Venice. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:128-138.
- Teira, E., Gasol, J.M., Aranguren-Gassis, M., Fernández, A., González, J., Lekunberri, I., Alvarez-Salgado, X. A., 2008. Linkages between bacterioplankton community composition, heterotrophic carbon cycling and environmental conditions in a highly dynamic coastal ecosystem. *Environ. Microbiol.* 10(4), 906-917.
- Troussellie, M., et al., 2002. Bacterial activity and genetic richness along an estuarine gradient (Rhône river plume, France) *Aquat Microb Ecol.* 28: 13-24.
- Vilicic, D., Vucak, Z., Skrivaic, AA, Grzetic, Z., 1989. Phytoplankton blooms in the oligotrophic open South Adriatic waters. *Marine Chemistry* 28: 89-107.
- Vukadin, I., Stojanoski, L., 1976. C:N:S:P ratio in the waters of the Middle and South Adriatic. *Rapports et*
- Proces-Verbaux des Reunions, C.I.E.S.M. 23,41-43. ZoBell, C. E. 1946 *Marine Microbiology. Chronica Botanica*
- Wetzel, R. G. (1982). *Limnology*. Saunders Publishing, Philadelphia
- Wu, Q.L., Zwart, G., Schauer, M., Kamst-van Agterveld, M., Hahn, M.W., 2006. Bacterioplankton Community Composition along a salinity gradient of sixteen high mountain lakes located on the Tibetan Plateau, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:8, 5478-5485.
- Zavatarelli, M., Baretta, J.W., Baretta-Bekker, J.G., Pinardi, N., 2000. The dynamic of the Adriatic Sea ecosystem. An idealized model of study. *Deep-Sea Research I* 47: 937-970.
- Zhou, J., Bruns, M.A., Tiedje, J.M., 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 316-322.
- Zurlini, G., 1996. Multiparametric classification of trophic conditions. The OECD methodology extended: combined probabilities and uncertainties application to the North Adriatic Sea. *The Science of the Total Environment* 182, 169-185.

Figure legends

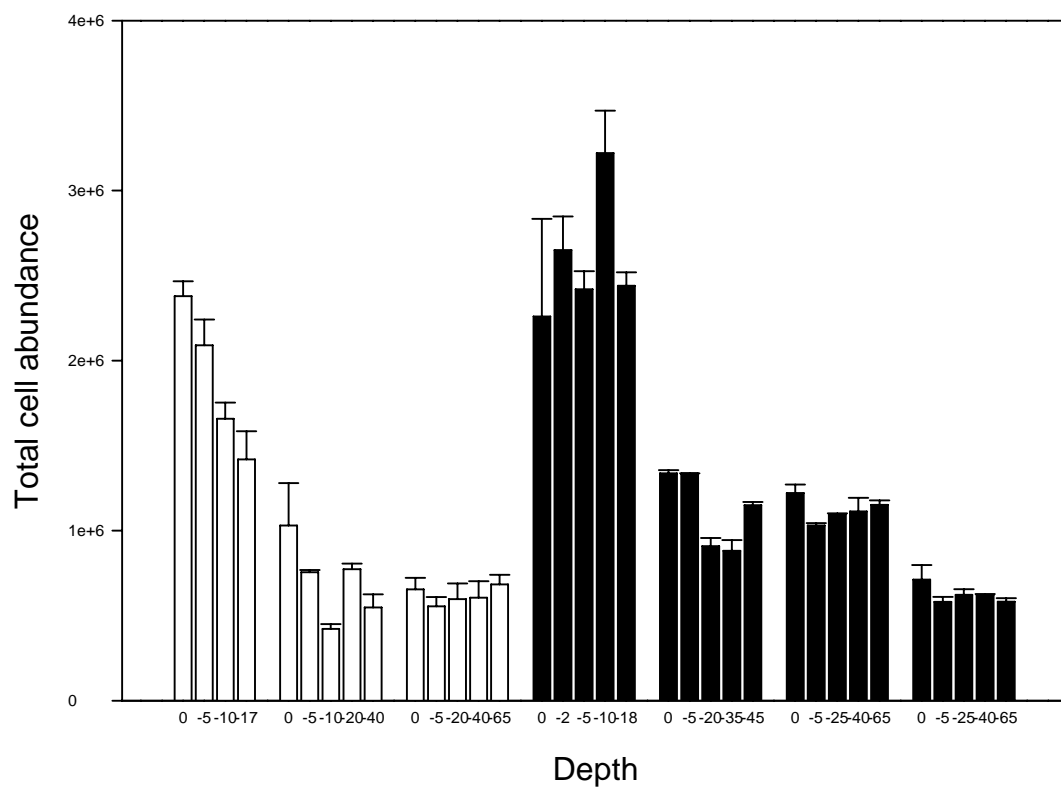
Figure 1. Study site

Figure 2. Total bacterial abundance (BAB, cell ml⁻¹) in March and November samples.

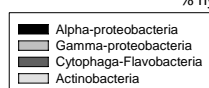
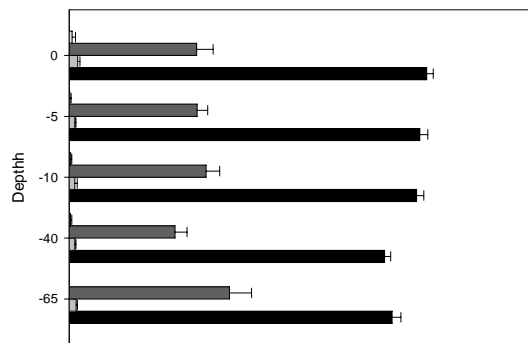
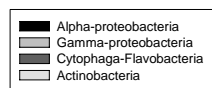
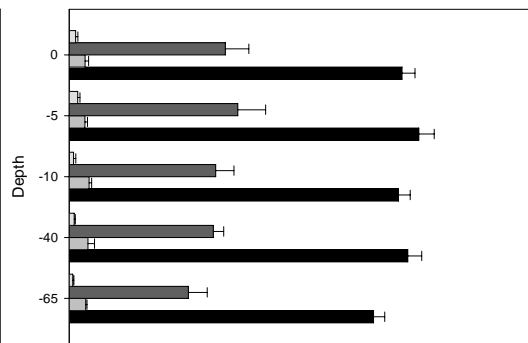
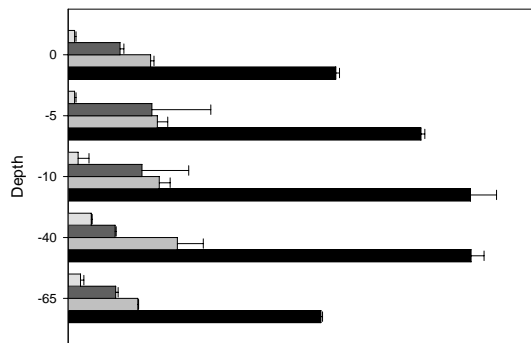
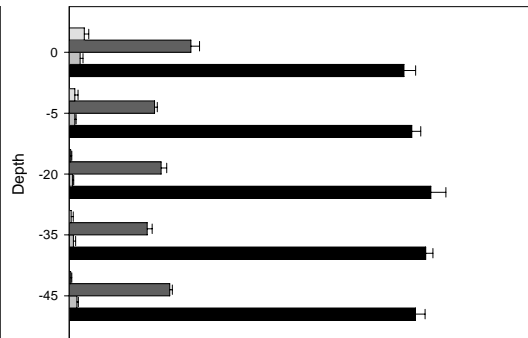
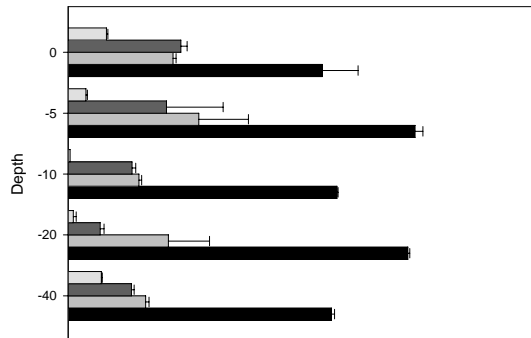
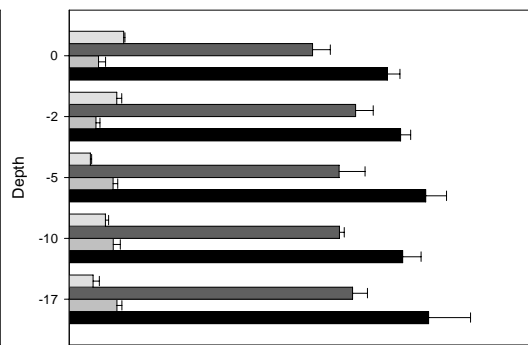
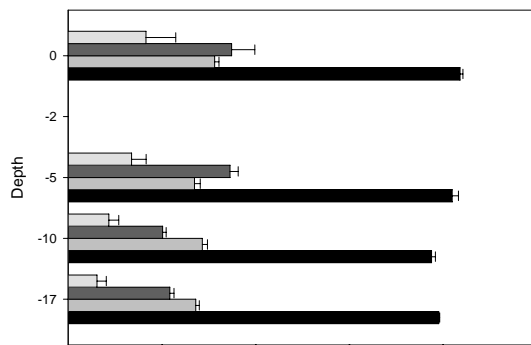
Figure 3. Correlation between BAB and POC (Total and alloctonous) and between BAB and Chlorophyll (Chl)

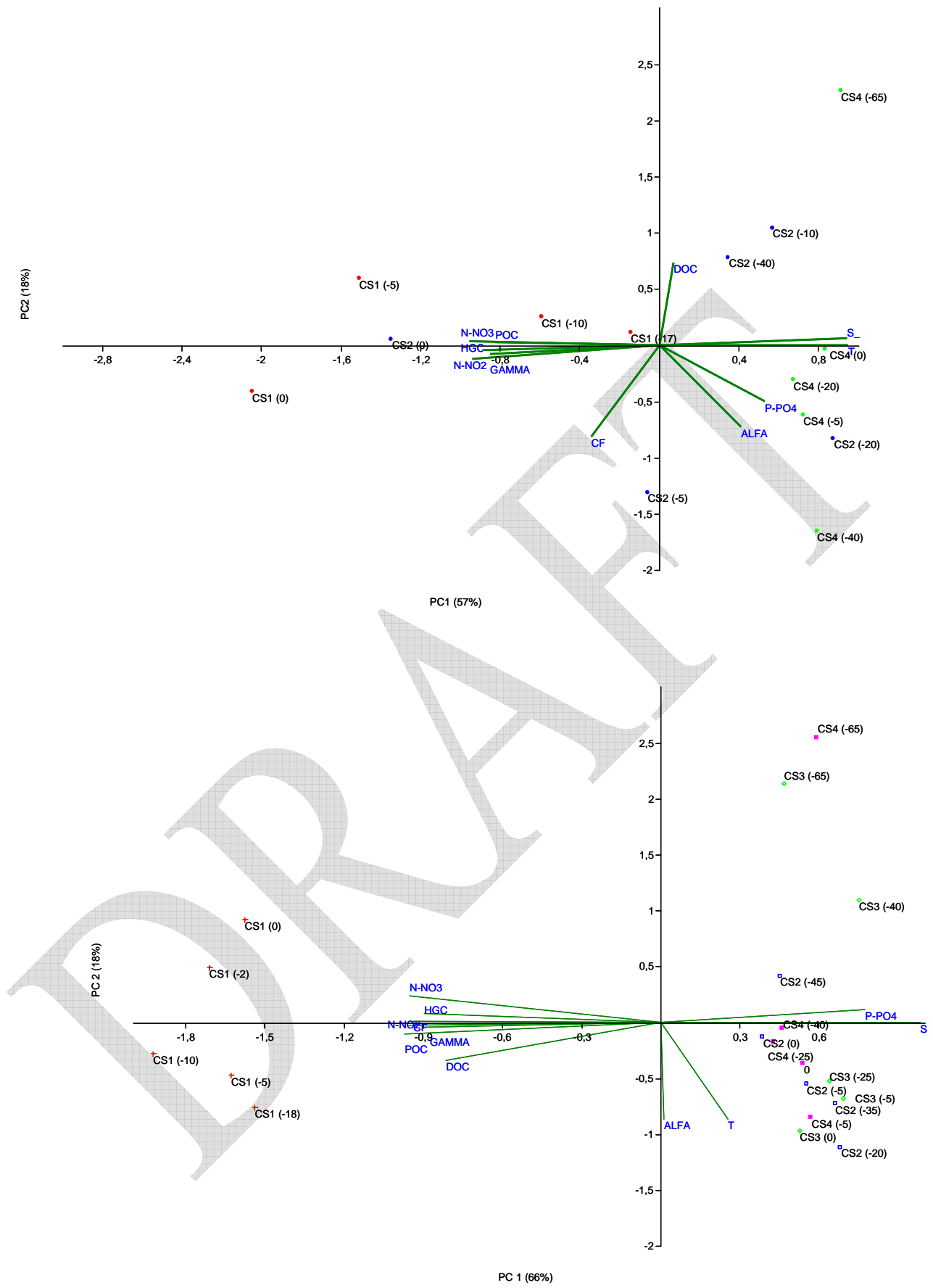
Figure 4. Abundance % of bacterial groups detected by HRP-probes (CARD-FISH)

Figure 5. Two dimensional plot of the Principal Component Analysis (PCA) performed for the whole data including physico-chemical parameters and group's abundance.



852





1 **Responses of biofilm bacterial communities to antibiotics in**
2 **river waters: a translocation study.**

3
4 **Authors:**

5 Proia L., Lupini G.**, Osorio V., Barceló D., Schwartz T.,
6 Amalfitano S.**, Fazi S.**, Romani A.M. and Sabater S.

7
8 **Institutions:**

9 Institute Aquatic Ecology University of Girona

10 **Water Research Institute (IRSA-CNR). Via Salaria Km 29.300 -
11 00015 Monterotondo - Rome, Italy

12
13 *Corresponding author.

14 Lorenzo Proia

15
16 **Keywords**

17 Antibiotics, CARD-FISH, DGGE, Enzyme activity.
18

DRAFT

Introduction

Anthropogenic activities are increasing the levels of priority and emerging contaminants derived from pollution point and diffuse sources, that reach freshwater ecosystems. A large number of these compounds are detectable in river waters and their effects on biological communities are currently a matter of active research (Ginebreda et al., 2010).

In particular, antibiotics released into aquatic environments (e.g. β -lactams, quinolones, tetracyclines, macrolides, sulphonamides; Kummerer et al., 2009) are a cause of concern, either as single compounds or in mixture, because of (i) the direct toxic effects at low concentrations on the aquatic microbes (Hernando et al., 2006) (ii) the potential to accelerate the acquisition of antibiotic resistance in several bacterial strains, including pathogens (Kummerer and Henninger, 2003; Obst et al., 2006) (iii) the widespread and persistent contamination of water resources, since their mineralization is essentially due to the presence of microorganisms with specific catabolic activities (Brain et al., 2004; Costanzo et al., 2005; Pomati et al., 2006).

Between 30% and 90% of any administered dose of most antibiotics to humans and animals are excreted as active substance (Rang et al., 1999), and their occurrence is therefore common in aquatic environments (Gros et al., 2007; Luo et al., 2011; Managaki et al., 2007). Hirsch et al. (1999) detected the presence of 18 compounds from four classes of antibiotics in German surface water samples, and Watkinson et al. (2009) detected antibiotics in the 90% of freshwater, estuarine and marine samples in six river catchments.

Antibiotics are bioactive compounds against bacteria in natural microbial communities, and their presence may lead both to short-term physiological alterations, including cell death and altered metabolic functions (biomass production, respiration, and excretion of extracellular enzyme activities), as well as to long-term changes in the microbial biomass or shifts in community composition (Bonnineau et al. 2010, Tlili et al. 2010).

Most studies concerning antibiotic effects in the aquatic environments have focused so far on planktonic microbial communities, and have disregarded the response of river biofilms. However microbial attached communities constitute the major component for the uptake, storage and cycling of carbon, nutrients and anthropogenic contaminants in many river sections (Pusch et al., 1998; Battin et al., 1999). Bacteria in biofilms occur together with other heterotrophs (fungi, protozoa), and autotrophs (diatoms, green algae and cyanobacteria), all of them embedded in an extracellular polymeric matrix (Lock 1993). The mutual benefits and the close spatial relations between different life-strategy organisms strictly reflects the quality of the surrounding flowing waters, generating a complex micro-ecosystem in which specific cross-kingdom metabolic processes and interactions may take place (i.e. bacterial utilization of algal exudates, Murray et al. 1986). One of the key processes of biofilm bacteria is their capability to mineralize organic molecules, where extracellular enzymes have a major role (Pusch et al. 1998; Romani, 2010; Proia et al., 2012), also influenced by the microbial interactions within the biofilm (Rier and Stevenson 2001; Francoeur and Wetzel 2003). Keeping in mind this complexity, it is unknown whether or not the presence of antibiotics in natural waters modifies the structure and function of microbial communities in riverine biofilms.

The objectives of this study were (i) to investigate the structural and functional modifications of biofilm bacterial community along an antibiotic pollution gradient in the River Llobregat (Spain), (ii) to evaluate the bacterial responses to biofilm translocation in river waters differently contaminated by antibiotics. It was hypothesized that the biofilm communities inhabiting environments with lower antibiotic presence would be the most affected when translocated to more polluted waters, and that this effect could be visible in the bacterial community composition of the biofilm. Testing this hypothesis in a field situation has been performed by means of translocation experiments. This methodology has been previously used for assessing the effects of metal pollution and industrial discharge in river biofilms (Ivorra et al., 1999; Victoria and Gomez, 2010; Tlili et al., 2011). The present study has analyzed the response of the biofilms after reallocating them in waters with progressively higher antibiotics contamination.

Material and Methods

Study Site

The Llobregat is a typical Mediterranean river flowing from north-east to south of the city of Barcelona (Catalonia, Spain). It is 165 km long and drains a catchment area of 4948 km² (Marcé et al. 2012). The water flow is characterized by a high variability with periodic flood and drought events modulated by the seasonal rainfall regime and the length of dry periods (Ricart et al. 2010). The mean annual precipitation is 3330 Hm³ and it has an annual average discharge of 693 Hm³ (Ginebreda et al. 2010). Nearly 30% of discharge flowing in Llobregat basin is used for drinking water (Muñoz et al., 2009). Together with its two main tributaries, the River Cardener and the River Anoia, the Llobregat River is a paradigm of overexploited Mediterranean rivers (Muñoz et al. 2009, Marcé et al. 2012). The middle-low part of the river is densely populated and interested by strong industrial, agricultural and urban activities. In fact its watershed is located into densely inhabited area (more than 3 million inhabitants) and receives significant inputs of industrial and urban wastewaters (~ 137 Hm³ per year, Ginebreda et al., 2010) as well as surface runoff from agricultural areas (Kuster et al., 2008). Moreover, salt inputs deriving from the ancient salt mines of the Cardener watershed have caused an increase in water salinity downstream, worsening the poor conditions of the low part of the river. In the present study, three sampling points were selected in the middle-lower part of the Llobregat River (Figure 1): two upstream the input of Anoia River (Castellbell, Mina de Terrassa) and one downstream (Sant Joan Despi).

Experimental design and biofilm translocation

The two upstream sampling sites Castellbell (A) and Mina de Terrassa (B) were selected as less polluted sites and Sant Joan Despi (C) as hotspot. River water was collected between two and three times per week from these three sites and was used as inoculums for biofilm growing in 18 independent mesocosms. Biofilms were colonized on glass slides (1 cm² each) placed at the bottom of each mesocosms (35 slides per mesocosm). The mesocosms consisted of sterile glass jars (19 cm in diameter, 9 cm high), filled with 1.5 L of river water which was re-circulated using a submersible pump (Hydor, Pico 300, 230 V 50 Hz, 4.5W). The water in each mesocosm was changed with respective river waters three times per week. All mesocosms were maintained in an incubator (SCLAB) under controlled temperature (18 °C) and light irradiance (150-180 μ mol photons m⁻² s⁻¹; darkness/light cycle of 12 h/12 h). After 25 days of colonization the translocation of the biofilms to a higher pollution site was performed. Three translocations (three replicate jars each) were performed: from Mina de Terrassa to Sant Joan Despi (B→C), from Castellbell to Mina de Terrassa (A→B,) and from Castellbell to Sant Joan Despi (A→C). Further three replicate glass jars previously incubated with Castellbell, Mina de Terrassa and Sant Joan Despi waters were maintained with the same conditions after the translocation, as controls. The biofilms were sampled two times during the experiment: one before and one nine days after translocation. Glass tiles from each mesocosm were randomly sampled.

Physicochemical parameters

Conductivity, temperature, pH and dissolved oxygen were measured with appropriate multiparameter sensor probes (HACH LANGE GMBH, Germany) in the field and in the jars before and after each water change. Water samples were collected for nutrient content from the glass jars before and after water renewals. All the water samples were filtered (Nylon Membrane Filters 0.2 μ m, WHATMAN, Maidstone, UK) prior to their analysis. Soluble reactive phosphate was measured following Murphy and Riley (1992). Samples for anions and cations analysis were preserved frozen until analysis by ion-chromatography (761 Compact IC, METROHM, Herisau, Switzerland).

The concentrations of 16 antibiotics, belonging to different families, were analyzed in surface waters using the multiresidue analytical method based on LC-MS/MS after solid-phase extraction described by Osorio et al. (2011).

Catalyzed Reported Deposition-Fluorescence In Situ Hybridization (CARD-FISH)

Biofilms replicates (1 cm² each) were scraped and treated by optimizing the density gradient centrifugation method described by Amalfitano and Fazi (2008). After treatment, bacterial cells were fixed (formaldehyde, 2%) directly on polycarbonate filters

(Whatman). Subsequently, CARD-FISH was performed according to the standard protocol (Pernthaler et al. 2002, 2004). Briefly, cells were immobilized on filter sections by embedding with 0.2% agarose (Invitrogen Life Technologies). Filters were permeabilized with lysozyme (1h at 37°C; 20 mg ml⁻¹, Fluka, Steinheim, Germany) and Proteinase K (25 min at 37°C; 0.034 U µl⁻¹ - SIGMA-ALDRICH, Steinheim, Germany, in Tris-EDTA buffer). Horseradish peroxidase labeled oligonucleotide probes were used to hybridize Bacteria (EUB I-III), Alpha-proteobacteria (ALF968), Beta-proteobacteria (BET42a), Gamma-proteobacteria (GAM42a), Cytophaga-Flavobacteria (CF319a) and Actinobacteria (HGC69a) at appropriate stringency conditions (Loy et al., 2007).

After washing steps, hybridized cells were double-stained with fluorescein-labelled tyramide (2 µl - SIGMA-ALDRICH, Germany - in 30% H₂O₂, PBS - pH 7.4, 5M NaCl, 10% w/v blocking reagent, 10% w/v dextran sulphate) and with 4'-6-diamino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg ml⁻¹ - Vector Laboratories, USA). The filters were observed and quantified by epifluorescence microscopy (EM) (Leica DM LB 30, at 1000X magnification).

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis (DGGE)

Biofilms replicates (1 cm² each) were scraped in 1 ml of pre-sterilized MilliQ water, and kept frozen at -80°C. DNA extraction was performed by thermo shock from pellets of scraped biofilm obtained after centrifugation of samples at 13 400 g for 30 min in a 5415D centrifuge (Eppendorf). Between 6 and 8 cycles of freeze (13-15 minutes at -80 °C) and defrost (7 minutes at 60 °C) were performed in order to obtain nucleic acids extract. DNA concentration and purity were determined spectrophotometrically from extracts using a Nanodrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (Nanodrop, DE).

Bacteria community structure and composition were determined by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). The universal primers 27F (5'-AGA GTT TGA TC(AC) TGG CTC AG-3') with a degenerate base pair at one position with a GCclamp (5'-CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-5') spanning *Escherichia coli* positions 8-27 and 517R (5'-ATT ACC GCG GCT GCT GG-3') spanning *E. coli* positions 518-534 were used for amplification of a 566-bp long fragment of the 16S rDNA of Eubacteria. PCR was performed as follows: an activation step for the polymerase (15 min at 95°C), 35 cycles with initial denaturation (30 s at 94°C), annealing (30 s at 54°C) and elongation (1.5 min at 72°C), followed by a final elongation step (7 min at 72°C). The PCR mix contained 2 ml of the template, 1.25 U of the HotStar DNA Taq polymerase (PeqLab, Erlangen, Germany), 1 ml of dNTPs (0.2 mM final concentration per vial and dNTP), 1.5 ml of each primer (20 pM final concentration per vial), and 5 ml of reaction buffer (10X), with the total volume being 50 ml. DGGE analysis of the PCR products (15-25 ml) was performed by means of the D-Code-System BioRadLaboratories GmbH, Munich, Germany) using polyacrylamide gels containing a 40-70% urea gradient. DGGE gels were run in 1 × TAE buffer (40 mmol l⁻¹ Tris, 20 mmol l⁻¹ acetate, 1 mmol l⁻¹ EDTA) at 70 V and 60°C for 16 h. The gels were stained with SYBR®Gold (Invitrogen, Karlsruhe, Germany). The stained gels were immediately analyzed using the Lumi-Imager Working Station (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). DGGE fingerprints were scored by the presence or absence of DNA bands. DNA bands (19 in total) were excised and sequenced for taxonomic identification. Bands were selected by comparing DGGE profiles of different samples, particularly bands commonly observed in all samples and bands characteristics of specific biofilms were selected. Selected bands were excised from the DGGE gel, and the slices were equilibrated in 15 ml of sterile water overnight at room temperature. The DNA extract was re-amplified by PCR and subjected to DGGE again to verify the purity of the PCR re-amplification product. PCR products were purified using a ExoSap kit (usb,Staufen, Germany). The sequencing reaction was carried out using the BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), and sequence detection was accomplished using the ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. DNA identification was achieved by comparing the nucleic acid sequences with GenBank sequences using the BLAST program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Bacterial cell viability

Intact and membrane-compromised cells, hereafter intended as live and dead bacteria, were stained using the LIVE/DEAD® Bacteria

Viability Kit L7012 (BacLight™, Molecular Probes, Invitrogen REF.). Colonized glass substrata were sonicated (<60 seconds, sonication bath at 40 W and 40 kHz, Selecta) and scraped (sterile silicone cell scraper, Nunc) to obtain a biofilm suspension. Samples were then diluted with pre filtered-sterilized water from mesocosms and 2 ml subsamples were incubated with 3 µl of 1:1 mixture of SYTO 9 and propidium iodide, for 15/30 minutes in dark. At the end of incubation, samples were filtered through a 0.2 µm black polycarbonate filters (Nuclepore, Whatman). Filters were then dried, placed on a slide with mounting oil (Molecular Probes) and counted by epifluorescence microscopy (Nikon E600, 1000x in immersion oil). Green and red (live and dead, respectively) bacterial cells were counted in 20 random fields per filter.

Extracellular enzyme activities

The extracellular enzyme activities leucine-aminopeptidase (EC 3.4.11.1), alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1-2) and β-D-1,4-glucosidase (EC 3.2.1.21) of biofilms were measured spectrofluorometrically immediately after collection by using the fluorescent-linked substrates L-leucine-4-methyl-7-coumarinylamide (Leu-AMC, Sigma-Aldrich), 4-methylumbelliferyl -phosphate (MUF-P, Sigma-Aldrich) and 4-methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside (4-MUF β-D-glucoside, Sigma-Aldrich), as described by Proia et al. (2012).

Statistical analysis

Differences among biofilms before translocation and responses of biofilm metrics to each translocation were analyzed by ANOVA with sampling site and treatment as fixed factors. Effects were analyzed post hoc with Tukey's b test. Analysis was performed using SPSS Version 15.0. Cluster analyses of bacterial community composition determined by DGGE were performed with PRIMER 6.0 using Bray-Curtis similarity matrix. The relation between biofilm bacterial metrics and antibiotics concentrations was analyzed using Spearman correlation tests. Data were log-transformed before the analyses.

The multi-group SIMilarity PERcentage test (SIMPER) using the Bray-Curtis similarity measure was run to assess which antibiotics were primarily responsible for the observed difference between all samples before and after the translocation. In the output table, antibiotics were sorted in descending order of contribution to group difference.

The Canonical Correspondence Analysis (CCA) was used to test how the environmental gradient of antibiotic concentrations affects the distribution patterns of the major bacterial groups in the analyzed samples, before and after the translocation experiments.

The Mantel test was applied to identify the degree of correlation among five different Bray-Curtis similarity matrices (5000 randomized runs), computed by the combination of 1) the antibiotic concentrations, 2) the bacterial structural parameters (CARD-FISH and DGGE bands) and 3) the bacterial functional parameters (Live/Dead ratio and enzymes). For the multivariate analyses, all data were log-transformed and elaborated by the PAST software package (PALaeontological STATistics, ver. 1.80).

Results

Physico-chemical water characterization

Dissolved oxygen (DO) and pH did not differ among sites, conductivity was relatively high in all the sampling points (Table 1) and increase significantly in C ($p < 0.05$). Concentration of soluble reactive phosphorus (SRP) increased gradually downstream while nitrates (NO₃) concentration was similar in A and B and increased significantly in C ($p < 0.05$, Table 1). Discharge during the study period was in general low (< 7m³ sec⁻¹) with significant lower flow in C respect to A and B (Table 1).

Antibiotics in water

A total of sixteen antibiotic compounds were detected in river water from the three sampling sites. Fifteen compounds from 4 different families of antibiotics (7 Macrolids, 5 Quinolones, 2 Sulfonamides, and 1 Tetracycline) were detected in river water (Figure 2). Moreover, the bacteriostatic antibiotic Trimethoprim (belonging to the class of chemotherapeutic agents) was detected at low concentrations in river water from each sampling site. Concentrations in Sant Joan Despi (C) were on average 6.1 times higher than in Castellbell (A) and Mina de Terrassa (B). The family

of sulfonamide antibiotics was the most concentrated at each sampling site followed by quinolones and macrolids families. The most concentrated compound at each sampling site resulted Sulfamethoxazole that showed a peak of 1576 ng L⁻¹ in C during the studied period. The most concentrated compound of the Macrolids family was Clarithromycin while among quinolones family Ofloxacin resulted the most concentrated one (Figure 2). The broad-spectrum antibiotic Tetracycline was detected at high concentration in SJD (average concentration = 336.61 ng L⁻¹) while concentrations in A and B were below 10 ng L⁻¹. SIMPER test indicated that 4 out of the 16 measured antibiotics had the major contributions to the overall average dissimilarity (19.9), respectively Enrofloxacin (2.7), Tetracycline (2.1), Roxithromycin (1.7), Ofloxacin (1.6).

Responses of biofilm bacterial community structure to translocation

The bacterial communities showed differences between sampling sites before translocation. The bacterial abundance increase significantly from A to C ($p < 0.05$). In particular, A biofilms resulted in bacterial density of $3.28 \pm 0.81 \times 10^7$ cells cm⁻², B biofilms resulted $4.45 \pm 1.48 \times 10^7$ cells cm⁻² and C biofilms resulted $5.70 \pm 2.28 \times 10^7$ cells cm⁻². The community composition analyzed by CARD-FISH highlighted that before translocation (Figure 3a), *Alpha*-proteobacteria abundance resulted significantly higher in C than in A and B, while *Beta* and *Gamma*-proteobacteria abundances were significantly lower in A biofilms respect to B and C ($p < 0.05$, Figure 3a). The Canonical Correspondence Analysis (CCA) of the bacterial community composition studied by CARD-FISH evidenced clear separation of communities grown in the three sampling sites and highlights the different pressure of antibiotic in the sites (Figure 4a). In particular, the Actinobacteria group (HCG) was highly associated to the 16 antibiotics compounds, and were important in C biofilms (Figure 4a). Differences in bacterial community composition of biofilms before translocation were confirmed by cluster analysis of DGGE gels (Figure 5). The sequencing of selected bands highlight that the Betaproteobacteria *Variovorax paradoxus* (Burkholderiales; Comamonadaceae) was common in biofilms from the three sampling sites. The Alphaproteobacteria *Roseomonas lacus* (Rhodospirillales; Acetobacteraceae) and the Gammaproteobacteria *Legionella pneumophila* (Legionellales; Legionellaceae) were the two species only identified in biofilms from site A. The Alphaproteobacteria *Rhodobacter* sp. (Rhodobacteriales; Rhodobacteraceae) and the Betaproteobacteria *Limnobacter* sp. (Burkholderiales; Burkholderiaceae) were detected in biofilms from site B. Finally, the Cyanobacteria *Cyanobium* sp. (Chroococcales) and the Betaproteobacteria *Acidovorax* sp. (Burkholderiales; Comamonadaceae) were two species only identified in biofilm from site C. The two complementary bacterial community structure analyses confirmed differences between communities and separated particularly site C from sites A and B.

Bacterial community structure changed after nine days of translocation. Biofilms translocated from A to B showed a significant increase of Betaproteobacteria, Cytophaga-Flavobacteria and Actinobacteria ($p < 0.05$, Figure 3b), while only Actinobacteria significantly increased in B→C biofilm ($p = 0.001$, Figure 3b). Gammaproteobacteria, Cytophaga-Flavobacteria and Actinobacteria increased significantly in the biofilm translocated from A to C ($p < 0.05$, Figure 3b). The Mantel test confirmed the significant correlation between antibiotic concentrations and bacterial community composition analyzed by CARD-FISH (Table 2). The CCA of bacterial community composition studied by CARD-FISH evidenced clear separation of translocated biofilm communities and highlights the role of antibiotics (Figure 4b). In particular, Actinobacteria (HCG) increase observed in all translocated biofilms resulted associated to increasing antibiotics concentrations. The Spearman test confirmed the positive correlation between Actinobacteria abundances and concentrations of all antibiotics families ($R \geq 0.63$, $p \leq 0.005$).

The similarity analysis with the DGGE results showed that the translocated communities tend to shift to communities at the more polluted site where samples were translocated (Figure 5), i.e. bacterial community of B→C biofilm tends to shift to assemblage more similar to C biofilms (Figure 5b).

Functional biofilm responses to translocation

Biofilm communities from the different sampling sites showed differences in bacteria viability. Particularly, biofilms in site C before translocation had significantly lower proportion of live bacteria than in sites A and B ($p < 0.001$, Figure 6a). No significant differences in extracellular enzymatic activities were observed among sampling sites before translocation (Figure 6a). Mantel test analysis evidenced slight significant correlation between antibiotics and functional parameters analyzed before translocation (Table 2). Bacterial community viability and functioning were affected after translocation. Significant increase of bacterial mortality was observed in the translocated biofilm of each translocation ($p < 0.001$, Figure 6b). Particularly, the most pronounced decrease of live/dead bacteria ratio was observed in A→C biofilms (Figure 6b). The Spearman test revealed significant negative correlation between the live/dead bacteria ratio and tetracycline concentrations ($R = -0.551$ $p = 0.018$). Translocated biofilms showed a significant decrease in the extracellular peptidase activity, particularly when transferred to site C ($p < 0.05$, Figure 6b). A significant decrease of extracellular phosphatase activity was measured in A→C biofilms ($p = 0.008$, Figure 6b); however, β -Glucosidase activity did not change after translocation. The Mantel test confirmed the significant correlation between functional biofilms metrics and antibiotics concentrations after translocation (Table 2).

Discussion

Antibiotics were detected in more than 90% of the water samples analyzed in the Llobregat, and concentrations were comparable (ng L⁻¹) to those observed in other impacted areas (Costanzo et al., 2005; Luo et al., 2011; Managaki et al., 2007; Watkinson et al., 2009). The entrances of antibiotics in running waters may occur either via point sources (PS) or non-point sources (NPS) (Watkinson et al., 2009). A continuous release of human used antibiotics in the aquatic environment is produced by PS waste waters, as well as NPS veterinary and agricultural used entering mainly after rainfall events. As a consequence, higher concentrations of antibiotics entering from PS should occur in densely populated areas during low flow dry periods (because of reduced dilution capacity) while peaks of compounds entering from NPS are expected in more rural zones during floods after rainfalls episodes. The higher concentrations of antibiotics in Sant Joan Despí are related both to the low flow recorded during the sampling (Table 1) as well as to the reception of a densely populated area. The most concentrated compounds were the sulfonamide Sulfamethoxazole, the macrolide Clarithromycin and the quinolone Ofloxacin, all of them used in human medicine. Thus, the input in the lower Llobregat was mostly via urban WWTP effluents.

The pollution gradient and differences in physical and chemical conditions might be responsible for the distinct bacterial community structure at the three selected sites. The higher proportion of dead bacteria in C biofilms could be explained by the influence of multiple pollutants on biofilms (Ricart et al. 2010, Muñoz et al. 2009, Proia et al. 2011). Furthermore, the higher autotrophic biomass observed in biofilm grown with Sant Joan Despí water (data not shown), may be another explanation for the higher proportion of death bacteria in these communities. An increased competition for resources as well as limited exchange with flowing water column because of biofilm thickness could generate unfavorable conditions for bacteria resulting in increased proportion of death cells. Moreover, the direct effect of antibiotics on non-resistant bacteria could be an extremely relevant factor for the outcome of the bacterial community within the biofilm. The live/dead bacteria ratio was negatively correlated with concentrations of quinolones and sulfonamides ($R < -0.75$; $p < 0.05$). In particular, Sulfamethoxazole is an anti-bacterial sulphonamide that inhibits the synthesis of dihydrofolic acid, a compound which bacteria must be able to produce to survive (Isidori et al., 2005). At the same time, the patterns of bacterial diversity obtained by molecular fingerprinting under the different conditions showed that the bacterial communities were structured mainly by sampling site (Figure 5).

The capacity of bacteria to develop resistance to antibiotics has been widely described (Luo et al., 2010, Manivasagan et al., 2011, Storteboom et al., 2010). Moreover, antibiotics in water could represent a selective pressure during the first phases of biofilm

development, when bacteria are early colonizers and cover the mineral surfaces with their polysaccharide glycocalyx (Barlocher and Murdoch 1989). The selection of different bacterial strains may occur in function of their resistance to antibiotics and other environmental stressors resulting in different assemblages at the end of the biofilm colonization process. The selective role of other chemical stressors (not as specific against bacteria as antibiotics) on bacterial community structure of biofilms has been demonstrated (Tlili et al., 2010). Our results also showed the significant increase of the main bacterial groups abundances (*Alpha*-, *Beta* and *Gamma* - proteobacteria) in C. Nevertheless, these increases seem to be associated to the general increase of bacteria density along the pollution gradient that could be also explained by water trophic state. In fact, the multivariate analysis (CCA) revealed that despite the increase of all the proteobacteria groups in Sant Joan Despí the HCG (Actinobacteria) group was associated to antibiotics gradient. Antibiotics, which act directly on the bacteria, will cause rapid elimination of the most sensitive bacteria and consequently promote the development of other taxa not subjected to a strong competition thus stimulating cell density increase (Fleeger et al., 2003; Le Jeune et al., 2007). Significant positive correlations between some antibiotics and abundances of some bacterial groups were observed in this work and confirm this hypothesis. Our study also revealed that the structural changes in the biofilm bacteria community before translocation were not associated with differences on the heterotrophic extracellular enzyme activities. This result confirms that the communities adapt to different physico-chemical conditions and are able to maintain similar functional levels.

Bacterial communities responded to translocation in terms of structure and function. The magnitude of the responses was associated with the magnitude of differences in antibiotics concentrations at sampling points. Particularly the most important responses were observed in communities transferred from less (Castellbell) to more (Sant Joan Despí) polluted site (A→C). The significant increase of bacterial mortality when biofilms were translocated downstream (Figure 5a) could be associated to the presence of antibiotics in water. Most of the antibiotics detected in river water are able to differently induce the bacterial cell death; even though the concentrations are very low, their reactivity as well as the continuous arrival of these products can affect bacterial viability and community composition. The increase of antibiotics concentration of 5.5 times in Sant Joan Despí could explain this increase of mortality when communities were transferred at this point. Moreover, this increase was even higher in the case of the protein synthesis inhibitor Tetracycline (36.8 times higher in C than in A and B). The negative correlation between live/dead ratio and tetracycline concentration ($R = -0.551$ $p = 0.018$) confirms the significant role of this antibiotic in the induction of bacterial mortality in biofilm translocated to Sant Joan Despí.

Nevertheless, bacterial mortality increase in biofilms translocated from Castellbell to Mina de Terrassa (A→B) suggests that some other factor could directly or indirectly induce bacteria mortality. In fact similar antibiotics concentrations at these two sampling points were detected (Figure 1). Indirect negative effects on bacteria of chemicals affecting autotrophs of river biofilms have been already described (Bonnineau et al., 2010; Proia et al., 2012) and need to be also considered. For example, the effect of Diuron on bacterial communities of treated biofilms has been observed and attributed to the indirect action of the herbicide on heterotrophs (Ricart et al., 2009; Lopez-Doval et al. 2009; Pesce et al 2006; Tlili et al. 2008). The complex trophic and metabolic interactions between autotrophs and heterotrophs within biofilm microbial community (Freeman and Lock 1995, Wetzel 1993, Rier et al. 2007) lies behind these observed indirect effects. The occurrence of many other priority and non-priority pollutants along the Llobregat River gradient described in other studies (Gros et al., 2007; Ricart et al., 2010) may be an additional source of direct and indirect stress for bacteria translocated to more polluted sites.

The translocation caused the increase of bacteria mortality, as well as the decrease of extracellular peptidase and phosphatase activities. These activities have been associated to heterotrophic bacteria that degrade high molecular weight molecules to obtain small peptides, amino acids and inorganic nutrients (Rosso & Azam 1987; Chrost 1991). Francoeur & Wetzel (2003) suggested that area-specific enzyme activity may be altered in 3 ways: (1) changes in the abundance of enzyme producing organisms, (2) changes in the

amount of enzyme produced per organism, and (3) changes in the activity of individual enzyme molecules. Two of the antibiotics with higher concentrations in the Llobregat (Tetracycline, Clarithromycin) are protein synthesis inhibitors and may therefore affect the amount of enzyme per cell produced, such as peptidase and phosphatase; indication of this possibility is that phosphatase negatively correlated with tetracycline after translocation ($R = -0.621$; $p = 0.006$). However, the significant decrease of extracellular phosphatase activity measured in A→C biofilms (Figure 5b) could also be related with the increase of inorganic phosphorus availability from A to C (2.3 times, table 1), that could inhibit the phosphatase expression (Chrost and Overbeck 1987). Finally, as bacteria are the enzyme producing organisms, the increase of bacterial mortality in response to translocation could be another reason for the extracellular enzymatic activity decrease in translocated communities. The conjoint of these results highlight how mature communities developed under different conditions maintain similar functional level while respond rapidly to changing environmental conditions.

Important changes in bacterial composition occurred in biofilms when transferred from less to more polluted sites. Particularly, the CCA evidences that HCG and CF were the groups associated with translocated communities and antibiotics gradient (Figure 4b). In fact, both groups increased in response to translocations (Figure 3b). High CG-content bacteria are Gram-positive bacteria of the class of Actinobacteria, a group that include some of the most common soil, freshwater and marine life microbes. The increase of this group could be directly related with the selective pressure of the antibiotics; this is confirmed by the positive correlation with all the families of antibiotics analyzed ($R > 0.63$; $p \leq 0.005$). Species of this bacterial group (and especially from the genus *Streptomyces*) are producers of hundreds of naturally occurring antibiotics (ex. Tetracycline, Streptomycin) (Watte et al., 2001). Antibiotics cause the rapid elimination of the most sensitive bacteria species and consequently promote the development of other more resistant taxa not subjected to a strong competition thus stimulating cell density increase (Fleeger et al., 2003; Le Jeune et al., 2007) as in the case of HCG in translocated biofilms. Similar selective pressure of antibiotics may account for the increase of Cytophaga Flavobacterium in translocated biofilms. CF is one of the most abundant bacteria group within aquatic environments (Kirchman et al., 2002). The positive correlation with tetracycline ($R = 0.491$ $p = 0.038$) suggests that resistant strains of this group of bacteria may be favored by high concentration of this antibiotic. Olapade and Leff (2004) demonstrated that this bacterial group clustered with conductivity, nitrates and soluble reactive phosphorus SRP in a study performed on epilithic biofilms of a US stream. Thus, the increasing conductivity, nitrates and SRP concentrations observed downstream in our study may be an additional co-factor explaining the CF behavior in translocated biofilm

Our study aimed to determine if the concentrations of antibiotics occurring in river waters can affect biofilm bacterial community structure and function. We showed that continuous entrance of antibiotics in freshwater systems may lead to structural and functional changes in microbial attached communities. Even though other factors may interfere with the effects of antibiotics on microbial communities, their presence in urban areas needs to be considered a risk factor for aquatic ecosystems.

- Amalfitano S., Fazi S., 2008. Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *Journal of Microbiological Methods*. 75: 237–243.
- Amann RI, Krumholz L, Stahl DA., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172(2): 762–770.
- Bärlocher F., Murdoch J.H., 1989. Hyporheic biofilms – a potential food source for interstitial animals. *Hydrobiologia*. 184: 61–67.
- Battin T., Butturini A., Sabater F., 1999. Immobilization and metabolism of dissolved organic carbon by natural sediment biofilms in two climatically contrasting streams. *Aquat Micro Ecol* 19:297–305.
- Berman, T., 1970. Alkaline phosphatases and phosphorus availability in lake Kinneret. *Limnol. Oceanogr.* 15, 663–674.
- Bonnineau C, Guasch H, Proia L, Ricart M, Geislinger A, Romani A.M, Sabater S. Fluvial biofilms: A pertinent tool to assess β -blockers toxicity. *Aquatic Toxicology* 2010; 96: 225–233.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day statistic renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 23(2): 371–382.
- Casas J.M., Rosas, H., Solé M., Lao C., 2003. Heavy metals and metalloids in sediments from the Llobregat basin, Spain. *Environmental Geology*. 44: 325–332.
- Cazelles B., Fontvieille D., Chau N.P., 1991. Self-purification in a lotic ecosystem: a model of dissolved organic carbon and benthic microorganisms dynamics. *Ecological Modelling*. 58: 91–117.
- Costanzo S.D., Murby J., Bates J., 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*. 51: 218–223.
- Chróst, R. J., 1990. Microbial ectoenzymes in aquatic environments. In Overbeck J., Chróst R.J. (eds), *Aquatic microbial ecology: biochemical and molecular approaches*. Springer-Verlag, New York: 47–78.
- Chróst R.J., 1991. Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In Chróst R.J. (eds), *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York: 29–59.
- Chróst, R.J., Overbeck J., 1987. Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplankton in lake plu/see (North German Eutrophic Lake). *Microbial Ecology* 13: 229–248.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., and Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22: 434–444.
- Fazi S., Amalfitano S., Pizzetti I., Pernthaler J., 2007. Efficiency of fluorescence in situ hybridization for bacterial cell identification in temporary river sediments with contrasting water content. *Systematic and Applied Microbiology* 30: 463–470.
- Flaherty C.M., Dodson S.I., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61: 200–207.
- Fleegeer, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317 (1–3): 207–233.
- Francœur S.N., Wetzel R.G., 2003. Regulation of periphytic leucine-aminopeptidase activity. *Aquatic Microbial Ecology*. 31: 249–258.
- Freeman C, Lock MA, 1995. The biofilm polysaccharide matrix: A buffer against changing organic substrate supply? *Limnol Oceanogr* 40:273–278.
- Ginebreda A. Muñoz I., López de Alda M., Brix R., López-Doval J., Barceló D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International* 36; 153–162.
- Gros M., Petrovic M., Barceló D., 2007. Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro River basin (Northeast Spain). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 26(8): 1553–1562.
- Guerra P., Eljarrat E., Barceló D., 2009. Analysis and occurrence of emerging brominated flame retardants in the Llobregat River basin. *Journal of Hydrology* 383: 39–43.
- Hernando MD, Mezcuca M, Fernandez-Alba AR, Barceló D., 2006. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*;69: 334–42.
- Hirsch R, Ternes TA, Haberer K, Mehlich A, Ballwanz F, Kratz KL., 1998. Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. A*. 815: 213–23.
- Isidori M., Lavorgna M., Nardelli A., Pascarella L., Parrella A., 2005. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Science of the Total Environment*. 346: 87–98.
- Lawrence, J.R., Swerhone, G.D.W., Wassenaar, L.I., Neu, T.R., 2005. Effects of selected pharmaceuticals on riverine biofilm communities. *Canadian Journal of Microbiology*. 51: 655–669.
- Le Jeune, A.H., Charpin, M., Sargos, D., Lenain, J.F., Deluchat, V., Ngayila, N., Baudu, M., Amblard, C., 2007. Planktonic microbial community responses to added copper. *Aquat. Toxicol.* 83(3): 223–237.
- Lock MA. Attached microbial communities in rivers. In: Ford TE (editor) *Aquatic Microbiology: an Ecological Approach*. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1993; p. 113–138.
- Luo Y., Mao D., Rysz M., Zhou Q., Zhang H., Xu L., Alvarez P.J.J., 2010. Trends in Antibiotic Resistance Genes Occurrence in the Haihe River, China. *Environ. Sci. Technol.* 44: 7220–7225.
- Luo Y., Xu L., Rysz M., Wang Y., Zhang H., Alvarez P.J.J., 2011. Occurrence and Transport of Tetracycline, Sulfonamide, Quinolone, and Macrolide Antibiotics in the Haihe River Basin, China. *Environ. Sci. Technol.* 45: 1827–1833.
- Managaki S., Murata A., Takada H., Tuyen B.C., Chiem N.H., 2007. Distribution of Macrolides, Sulfonamides, and Trimethoprim in Tropical Waters: Ubiquitous Occurrence of Veterinary Antibiotics in the Mekong Delta. *Environ. Sci. Technol.* 41: 8004–8010.
- Manivasagan P., Rajaram G., Ramesh S., Ashokkumar S., Damotharan P., 2011. Occurrence and seasonal distribution of antibiotic resistance heterotrophic bacteria and physico-chemical characteristics of Muthupettai mangrove environment, southeast coast of India. *Journal of Environmental Science and Technology*. 4(2): 139–149.

- Marcé, R., J. Honey-Rosés, A. Manzano, L. Moragas, B. Catllar and S. Sabater. 2012. The Llobregat River Basin: a paradigm of impaired rivers under climate change threats. In S Sabater, A Ginebreda, D Barceló (eds.). The Llobregat River: the story of a polluted river. Handbook in Environmental Chemistry, Springer. In press.
- Murray RE, Cooksey KE, Priscu JC (1986) Stimulation of bacterial DNA synthesis by algal exudates in attached algal-bacterial consortia. Appl Environ Microb 52:1177-1182.
- Kirchman D.L., 2002. The ecology of *Cytophaga-Flavobacteria* in aquatic environments. FEMS Microbiology Ecology 39: 91-100.
- Kobayashi Y., Kim C., Yoshimizu C., Kohzu A., Tayasu I., Nagata T., 2009. Longitudinal changes in bacterial community composition in river epilithic biofilms: influence of nutrients and organic matter. Aquat Microb Ecol. Vol. 54: 135–152.
- Kümmerer K., 2009a. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. Chemosphere. 75: 417- 434.
- Kümmerer K., 2009b. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II. Chemosphere. 75: 435–441.
- Kümmerer K., Henninger A., 2003. Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluents. Clinical Microbiology and Infection. 9(12): 1203-1214.
- Kuster, M., López de Alda, M.J., Hernando, M.D., Petrovic, M., Martin-Alonso, J., Barceló, D., 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain). Journal of Hydrology 358, 112–123.
- López-Doval JC, Ricart M, Guasch H, Romaní AM, Sabater S, Muñoz I. Does Grazing Pressure Modify Diuron Toxicity in a Biofilm Community? Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2010; 58: 955-962.
- Muñoz, I., López-Doval, J.C., Ricart, M., Villagrana, M., Brix, R., Geislinger, A., Ginebreda, A., Guasch, H., López de Alda, M., Romaní, A.M., Sabater, S., Barceló, D., 2009. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (NE Spain). Environmental Toxicology and Chemistry. 28 (12); 2706–2714.
- Neumann N.J., Blotz A., Wasinska-Kempka G., Rosenbruch M., Lehmann P., Ahr H.J., Vohr H.W., 2005. Evaluation of phototoxic and photoallergic potentials of 13 compounds by different in vitro and in vivo methods. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 79: 25–34.
- Obst U, Schwartz T, Volkmann H. Antibiotic resistant pathogenic bacteria and their resistance genes in bacterial biofilms. Int. J. Artif. Organs. 29(4): 387–94.
- Olapade O, Leff LG, 2004. Seasonal dynamics of bacterial assemblages in epilithic biofilms in a northeastern Ohio stream. J North Am Benthol Soc 23:686–700.
- Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., 2002. Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria, Appl. Environ. Microbiol. 68: 3094–3101.
- Pernthaler A., Pernthaler J., Amann R., Sensitive multicolour fluorescence in situ hybridization for the identification of environmental microorganisms, in: Kowalchuk G.A., De Bruijn F.J., Head I.M., Akkermans A.D.L., van Elsas J.D. (Eds.), Molecular Microbial Ecology Manual, second ed., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 2004, pp. 711–726.
- Pesce S, Fajon C, Bardot C, Bonnemoy F, Portelli C, Bohatier J. Effects of the phenylurea herbicide diuron on natural riverine microbial communities in an experimental study. Aquatic Toxicology 2006; 78: 303–314.
- Polz M.F, Hunt D.E., Preheim S.P., Weinreich D.M., 2006. Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic. Phil. Trans. R. Soc. B. 361: 2009-2021.
- Pomati F., Castiglioni S., Zuccato E., Fanelli R., Vigetti D., Rossetti C., Calamari D., 2006. Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. Environ. Sci. Technol. 40: 2442-2447.
- Proia, L., Cassiò, F., Pascoal, C., Tlili, A., Romaní, A.M., in press. The use of attached microbial communities to assess ecological risks of pollutants in river ecosystems. The role of heterotrophs, in: Guasch, H., Ginebreda, A., Geislinger, A. (Eds.), Emerging and Priority Pollutants in Rivers: Bringing science into River Management Plans. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, in press.
- Pusch M., Fiebig D., Brettar I., Eisenmann H., Ellis B.K., Kaplan L.A., Lock M.A., Naegeli M.W., Traunsperger W., 1998. The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. Freshwater Biol 40:453-495.
- Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., 1999. Pharmacology. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Ricart, M., Barceló, D., Geislinger, A., Guasch, H., López de Alda, M., Romaní, A.M., Vidal, G., Villagrana, M., Sabater, S., 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. Chemosphere. 76, 1392–1401.
- Ricart M., Guasch H., Barceló D., Brix R., Conceição M.H., Geislinger A., López de Alda M.J., López-Doval J.C., Muñoz I., Postigo C., Romaní A.M., Villagrana M., Sabater S., 2010. Primary and complex stressors in polluted mediterranean rivers: Pesticide effect on biological communities. Journal of Hydrology. 383: 52–61.
- Rier, S.T., Stevenson R.J., 2002. Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. Hydrobiologia. 489: 179-184.
- Rier ST, Kuehn KA, Francoeur SN, 2007. Algal regulation of extracellular enzyme activity in stream microbial communities associated with inert substrata and detritus. J. N. Am. Benthol. Soc. 26: 439-449.
- Romaní, A.M., Sabater, S., 1999. Effect of primary producers on the heterotrophic metabolism of a stream biofilm. Freshwater Biol. 41, 729-736.
- Rosso, L.A., Azam, F., 1987. Proteolytic activity in coastal oceanic waters: depth distributions and relationship to bacterial populations. Marine Ecology Progress Series 41: 231-240.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol. Ecol. 43(3), 325-336.
- Sendzik J, Shakibaei M, Schafer-Korting M, Stahlmann R., 2005. Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. Toxicology. 212(1): 24–36.
- Siuda, W. Chrost R.J., 1987. The relationship between alkaline phosphatase (APA) activity and phosphate availability for phytoplankton and bacteria in eutrophic lakes. Acta Microbiologica Polonica 36: 247-258.
- Storteboom H., Arabi M., Davis J.G., Crimi B., Pruden A., 2010. Tracking Antibiotic Resistance Genes in the South Platte River Basin Using Molecular Signatures of Urban, Agricultural, And Pristine Sources. Environ. Sci. Technol. 44: 7397–7404.
- Tamtam F., Mercier F., Le Bot B., Eurin J., Dinh Q.T., Clément M., Chevreuil M., 2008. Occurrence and fate of antibiotics in the

866 Seine River in various hydrological conditions. *Science of the*
867 *Total Environment*. 393: 84-95.

868 Tlili A., Bérard A., Roulier J., Volata B., Montuelle B., 2010. PO₄³⁻
869 dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic
870 biofilm communities to copper and diuron. *Aquatic*
871 *Toxicology*. 98: 165–177.

872 Tlili A, Dorigo U, Montuelle B, Margoum C, Carlier N, Gouy V,
873 Bouchez A, Bérard A. Responses of chronically
874 contaminated biofilms to short pulses of diuron. An
875 experimental study simulating flooding events in a small
876 river. *Aquatic Toxicology* 2008; 87: 252–263.

877 Tomàs, X., Sabater, S., 1985. The diatom flora of the Llobregat river
878 and its relation to water quality. *Verhandlungen Internationale*
879 *Vereinigung Limnologie*. 22; 2348–2352.

880 Watkinson A.J., Murby E.J., Kolpin D.W., Costanzo S.D., 2009. The
881 occurrence of antibiotics in an urban watershed: From
882 wastewater to drinking water. *Science of the Total*
883 *Environment*. 407: 2711-2723.

884 Watkinson W.D., Cabelli V.J., 1985. Effect of Fecal Pollution on
885 *Vibrio parahaemolyticus* Densities in an Estuarine
886 Environment. *Applied and Environmental Microbiology*.
887 49(5): 1307-1313.

888 Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M., Bhole B.D., 2001. How many
889 antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch.*
890 *Microbiol.* 176: 386–390.

891 Wetzel RG, 1993. Microcommunities and microgradients: linking
892 nutrient regeneration, microbial mutualism, and high sustained
893 aquatic primary production. *Netherlands Journal of Aquatic*
894 *Ecology* 27: 3–9.

895 Yokokawa T., Nagata T., Cottrell M.T., Kirchman D.L., 2004.
896 Growth rate of the major phylogenetic bacterial groups in the
897 Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 49(5): 1620–1629.

921

Table 1. Results of physical-chemical variables measured at each sampling site. Values are expressed as mean values and SD in parenthesis (n= 16).

	Discharge (m ³ sec ⁻¹)	Conductivity (μS cm ⁻¹)	pH	Oxygen (mg L ⁻¹)	SRP (μg L ⁻¹)	N-NH ₄ (mg L ⁻¹)	N-NO ₃ (mg L ⁻¹)
A	6.06 (0.50)	1649.5 (22.6)	8.52 (0.11)	10.89 (1.37)	44.□0 (57.18)	0.09 (0.10)	7.40 (0.87)
B	4.85 (0.72)	1695.8 (38.7)	8.43 (0.06)	9.77 (1.09)	70.85 (50.73)	0.13 (0.03)	7.10 (0.83)
C	2.91 (1.04)	2045.0 (67.4)	8.44 (0.13)	10.29 (1.38)	104.63 (38.04)	0.07 (0.04)	10.84 (2.62)

922

|

923
924
925
926

Table 2. Mantel tests between four different Bray-Curtis similarity matrices 1) the antibiotic concentrations, 2) the bacterial community structure (CARD-FISH and DGGE), and 3) function (live/dead ratio and enzyme activities) of biofilms, before and after the translocation experiments (respectively the upper and the lower part in the table). The Pearson's correlation coefficient (R) were calculated between all the entries in the two matrices and compared in 5000 random permutations. The reported p-values are one-tailed.

	Antibiotics	Structure	Function
Antibiotics	-	R= 0.003 p= 0.388	R= 0.403 p= 0.013
Structure	R= 0.108 p= 0.041	-	R= 0.015 p= 0.354
Function	R= 0.274 p= 0.023	R= 0.578 p= 0.0002	-

DRAFT

Figure 1. Study site with selected sampling sites (represented by stars) in the Llobregat River.

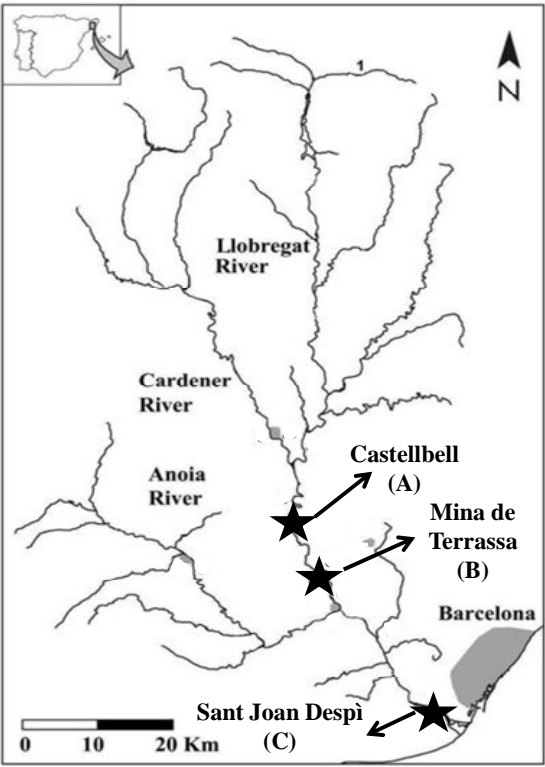
Figure 2. Average concentrations of antibiotics (n=9) measured at each sampling site.

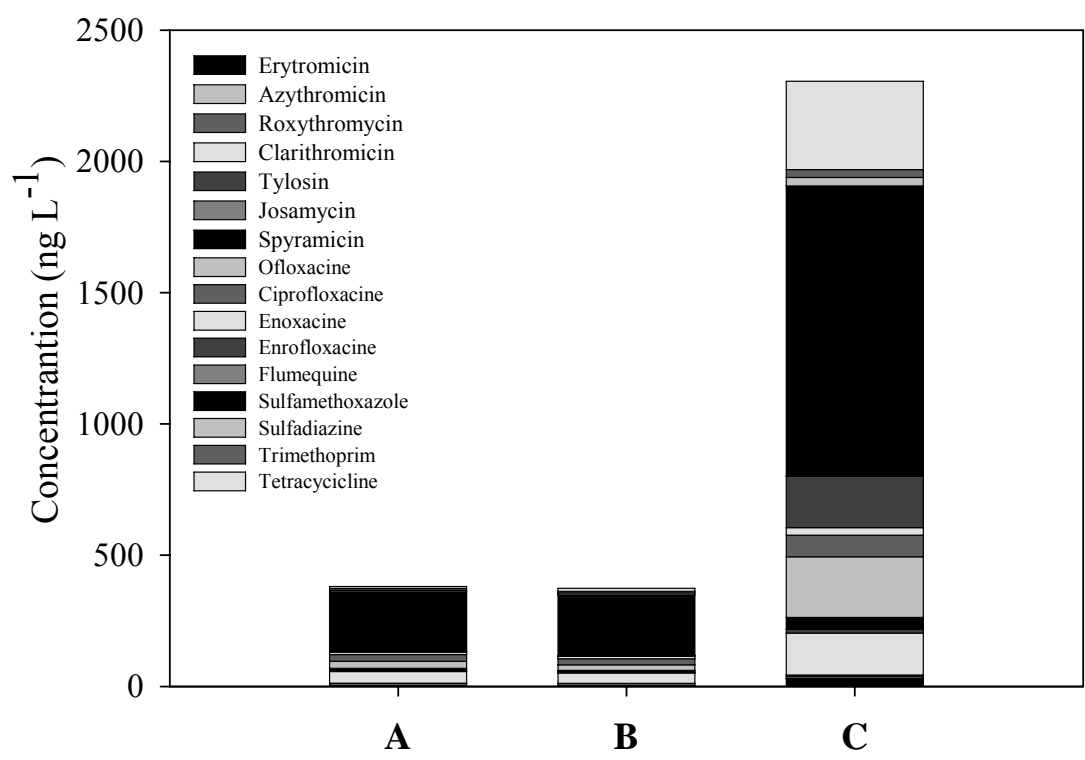
Figure 3. Abundances of the bacterial groups analysed by CARD-FISH before (a) and after (b) the translocation experiments. Values are means and standard deviations (n = 3).

Figure 4. Responses of the biofilm bacterial groups to antibiotic contamination in river water before (a) and after (b) the translocation experiments as expressed by the Canonical Correspondence Analysis (CCA).

Figure 5. Cluster analysis based on Bray-Curtis similarity of biofilm bacterial community analyzed by DGGE in: a) translocation from CB to MT, b) translocation from MT to SJD, and c) translocation from CB to SJD.

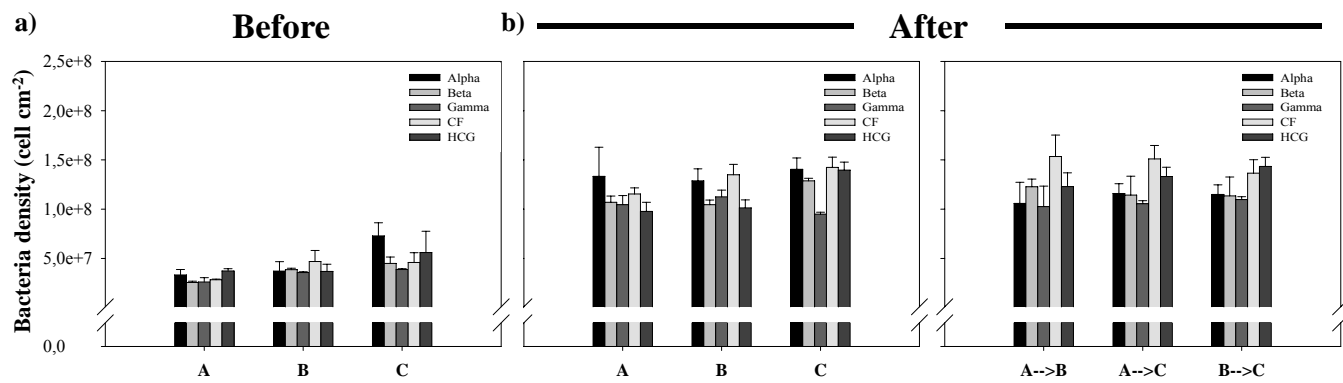
Figure 6. Functional responses of biofilm before (a) and after (b) the translocation experiments. Values are means and standard deviation (n = 3).

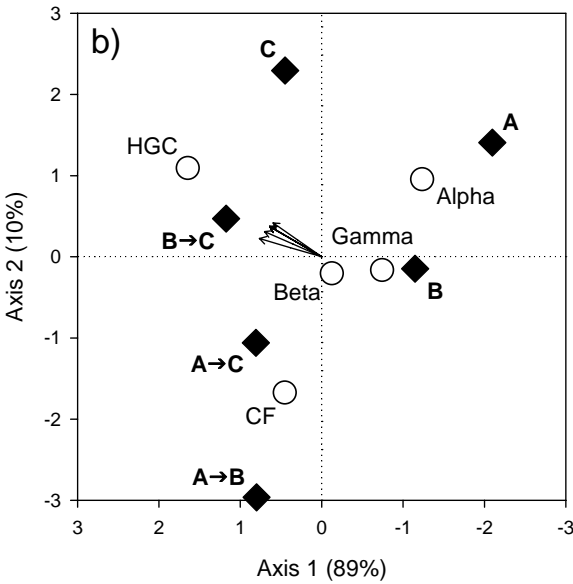
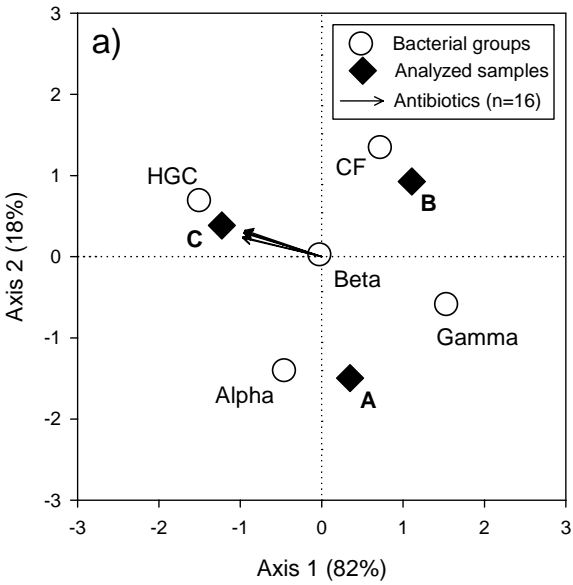


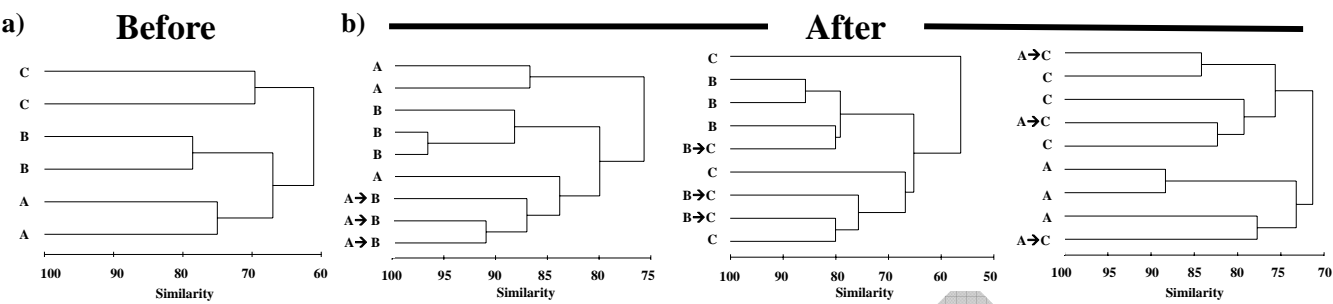


968
969
970
971

972 Figure 3

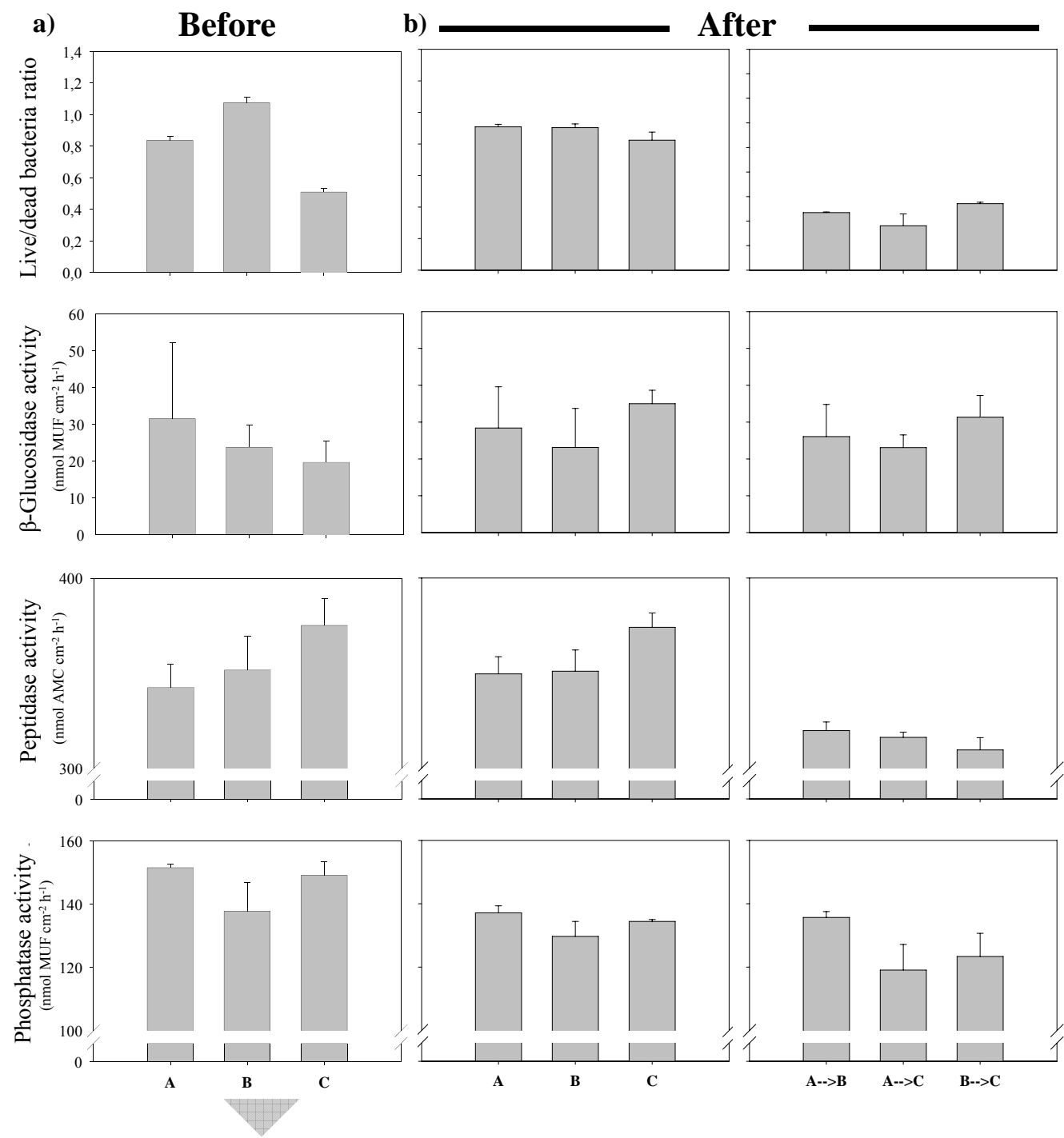






1021
1022

Figure 6



1023
1024
1025
1026